

**VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE
SCHUTZWIRKUNG VON
O - (B - HYDROXYETHYL) - RUTSIDEN UND
TROXERUTIN AN DER
VENA AURICULARIS DES SCHWEINES**

HANS LAYER

1988

Disbui. München
1988

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie
und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. W. Forth

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. Wolfgang Felix

vorgelegt über

Prof. Dr. A. Petter

Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vergleichende Untersuchungen über die Schutzwirkung von
O-(β -Hydroxyethyl)-rutosiden und Troxerutin
an der Vena auricularis des Schweines

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Hans Layer

aus Beutelsbach

München 1988

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München**

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. A. Petter

Korreferent: Prof. Dr. H. Berner

Tag der Promotion: 29. Juli 1988

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATUR	3
1.	Allgemeine Physiologie der Blutgefäße	3
1.1	Aufbau der Arterien und Venen	3
1.2	Die Gefäße der terminalen Strombahn	4
1.3	Die Regulierung des Gefäßtonus	6
2.	Pathophysiologie der Venen	6
2.1	Der variköse Symptomenkomplex	7
2.2	Die chronische Veneninsuffizienz	9
2.3	Ödeme	9
3.	Therapeutische Maßnahmen	10
4.	O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside	12
4.1	Vorkommen	12
4.2	Chemie	13
4.3	Pharmakokinetik	15
4.4	Toxizität und Nebenwirkungen	17
4.5	Pharmakodynamik	18
4.6	Zum Wirkungsmechanismus von HR	19
5.	Etacrynsäure	22
III.	METHODIK	25
1.	Versuche an isolierten Ohrrendvenen	25
1.1	Präparation	25
1.2	Perfusionstechnik	26
1.3	Versuchsablauf	27
1.4	Auswertung der Meßdaten	29
1.5	Diskussion der Methodik	30
1.6	HPLC - Trennung	31
1.7	Geräte und Substanzen	32

IV. ERGEBNISSE	33
1. Protektive Wirkungen von O-(β -Hydroxyethyl)-Rutosiden an isolierten Schweineohrrandvenen	33
1.1 Abhängigkeit der Schädigung mit Etacrynsäure 0.1% von der Einwirkzeit.	34
2. Schutzwirkung von HR bei 7.5-minütiger Schädigung	40
3. Schutzwirkung von HR bei 2.5-minütiger Schädigung	44
4. Schutzwirkung von Troxerutin bei 2.5-minütiger Schädigung	50
5. Zur Wirkung von HR und Troxerutin auf die Gefäße	55
6. Zusammensetzung von HR und Troxerutin	58
V. DISKUSSION	60
1. In-vitro-Versuche	60
2. Zeitabhängigkeit der Schädigung	61
3. Wirkung von HR und Troxerutin	65
4. Gefäßschützende Wirkung von HR	66
4.1 Versuche mit 7.5-minütiger Einwirkdauer	66
4.2 Versuche mit 2.5-minütiger Einwirkdauer	67
5. Gefäßschützende Wirkung von Troxerutin	68
6. Wirkungsmechanismus der O-(β -Hydroxyethyl)-Rutose	69
VI. ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	72
VII. LITERATURVERZEICHNIS	74

I. EINLEITUNG

Auf Grund der in unserer Zeit immer mehr zunehmenden prädisponierenden Faktoren wie Bewegungsarmut, stehende Arbeitsweise oder venenabdrückendes, falsches Sitzen erlangt die chronische venöse Insuffizienz eine hervorragende, immer noch zunehmende Bedeutung als Zivilisationskrankheit. Während die Venopathien bei jüngeren Patienten noch ein vorwiegend kosmetisches Problem darstellen, kann dieses in der Regel progredient verlaufende Venenleiden bei älteren Menschen zu ganz erheblichen Einschränkungen der Lebensqualität, ja bis zur Arbeitsunfähigkeit und Invalidität führen.

Nach der "Tübinger Studie" (FISCHER 1981), die eine für die Bundesrepublik Deutschland repräsentative Hochrechnung darstellt, leiden ca. 5,3 Millionen Bundesbürger an Veneninsuffizienz und ca. eine Million an einem Geschwürsleiden der Beine. Nur 14 % der über Venenleiden befragten Personen erklärten sich frei von jeglichen Venenveränderungen. Etwa 5 % der venenkranken Patienten wurden auf Grund ihrer Erkrankung arbeitsunfähig, oft verbunden mit einem gesellschaftlichen und finanziellen Abstieg.

Die "Tübinger Studie" zeigt eindrucksvoll auf, daß die venösen Beinleiden nicht nur ein medizinisches Problem darstellen, sondern daß durch dieses Leiden für das öffentliche Gesundheitswesen erhebliche Kosten entstehen. Die Dringlichkeit einer frühzeitigen, gezielten Therapie wird angesichts dieser Zahlen offensichtlich.

In der vorbeugenden Behandlung und in der Pflege noch geringer oder mittlerer Venopathien spielen die zur Verfügung stehenden, innerlich oder äußerlich anwendbaren Pharmaka eine besonders wichtige Rolle. Sie werden vom Patienten auch bevorzugt gegenüber den komprimierenden Maßnahmen.

Diese Venenmittel umfassen drei Gruppen: die natürlichen, wie das Aescin; halbsynthetische, wie die Rutoside und vollsynthetische, wie das Benzaron. Die Rutoside stellen als halbsynthetisch veränderte, pflanzliche Glykoside eine Substanzgruppe dar, die wesentlicher Bestandteil von Präparaten ist, die sich als sog. Venenmittel im Handel befinden. So wird das Venoruton^R, eine standartisierte Mischung aus Mono-, Di-, Tri- und Tetrahydroxyethylrutosiden, seit langem sowohl oral als auch parenteral eingesetzt. Andere Firmen haben eigene Präparate mit jeweils etwas anderer Zusammensetzung, oder mit bevorzugtem Gehalt von Trihydroxyethylrutosid (Troxerutin).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte nun das Modell "Ohrtrandvene" in der Anwendung geprüft werden. Die Schädigung der Venen mit Etacrynsäure sollte in Abhängigkeit von der Durchflußzeit geklärt werden und dann an diesem Modell die Schutzwirkung von Venoruton^R und von Troxerutin vergleichend untersucht werden. Die Veränderungen der chemischen Eigenschaften von den Mono- zu den Di-, Tri- bis zum Tetrahydroxyethylrutosid sind nur geringgradig, sozusagen "fließend". Es ist zu vermuten, daß die jeweilige Zusammensetzung des Gemisches von Bedeutung für die Schutzwirkung auf die Venen ist.

II. LITERATUR

1. Allgemeine Physiologie der Blutgefäße

1.1 Aufbau der Arterien und Venen

Die Arterien und Venen haben einen gemeinsamen Bauplan: 1. Tunica interna (Intima), 2. Tunica media, 3. Tunica externa (Adventitia). Allerdings lassen sich diese Schichten bei den Venen nicht so deutlich abgrenzen wie bei den Arterien.

Die Tunica externa besteht aus einem lockeren, elastischen Netzwerk, das sich in peripherer Richtung auflockert und aus einem Gitter kollagener Fasern. Dieses Gewebe setzt sich ohne scharfe Grenze in das benachbarte Bindegewebe fort und sorgt so für die Fixation in der Umgebung (BARGMANN 1977).

Die Tunica media ist eine, bei Arterien deutlich mächtigere, Schicht aus glatten Muskelzellen. Sie wird bei den arteriellen Gefäßen durch die Membrana elastica externa deutlich von der Tunica externa abgegrenzt. Es treten zirkuläre, spiralige und längsverlaufende Muskelzüge auf. Dazwischen sind elastische Fasern, Membranen und Kollagenfasern eingelagert. Bei den Arterien unterscheidet man noch die herznahen Arterien vom elastischen Typ, mit sehr vielen elastischen Fasern und Membranen, von denen des muskulösen Typs der Kreislaufperipherie, die ihren Durchmesser aktiv verändern können. Bei den Venen überwiegen in Herznähe ebenfalls die kollagenen und elastischen Fasern, während die peripheren Venen durch vermehrte Muskelzellen ihren Durchmesser verändern können, d.h. sie sind einerseits für den Druckabfall in diesem Bereich verantwortlich, andererseits haben sie eine Speicherfunktion, d.h. sie bestimmen das Angebot an Blut für das Herz. Dies gilt beson-

ders in den Extremitäten, die einem stärkeren hydrostatischen Druck ausgesetzt sind (NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE 1976).

Die Tunica interna besteht aus einer lumennahen, einzelligen Endothelschicht und einer Basalmembran darunter. In den Arterien und Venen ist diese Endothelschicht 0.5 bis 1.2 μm dick. Bei den arteriellen Gefäßen ist sie besonders deutlich durch die Tunica elastica interna von der Media abgegrenzt (ROBERTSEN, ROSEN 1977).

1.2 Die Gefäße der terminalen Strombahn

Arteriolen, Kapillaren und Venulen bilden die terminale Strombahn. Die Arteriolen sind die kleinsten präkapillären Arterien, die einen Durchmesser von 10-30 μm haben und deren Media nur aus einer Lage glatter Muskelzellen besteht. Die Tunica elastica interna geht peripher zunehmend im Kapillargrundhäutchen auf. Dieser Gefäßabschnitt erfüllt in Bezug auf Steuerung des allgemeinen Blutdruckes, der lokalen Durchblutung und der Filtration wichtige Aufgaben (BARGMANN 1977, GAUER 1972).

Die postkapillären Gefäße bestehen nur aus Endothel und einer zarten Adventitia d.h. sie sind frei von Muskelzellen. Im Bereich der Venulen treten dann Muskelzellen zwischen der Basallamina des Endothels und der Adventitia auf. Die Venulen erreichen eine Dicke von 2-3 mm (BARGMANN 1977). Sowohl in den Kapillaren als auch im Bereich der Venulen finden Austauschvorgänge statt (GAUER 1972). Die in Richtung Venule zunehmende Passagemöglichkeit für Proteine wird von HAUCK und SCHRÖER (1969) als Folge einer Heteroporesität der Gefäßwand interpretiert. Neben den von PAPPENHEIMER (1951) geforderten kleinen Poren (ca. 60 Å) sollen die Venulen zusätzlich großlumige Poren (ca. 250-500 Å) besitzen.

Den größten Teil des Gefäßsystems bilden die Blutkapillaren. Ihr Durchmesser liegt zwischen 6 und 30 μm . Ihr Wandaufbau besteht aus dem Endothel, der Basalmembran und den Perizyten (Rouget-Zellen) (NICKEL, SCHUMMER, SEIFERLE 1976). Die Durchlässigkeit dieser Schichten hängt vom Verhalten des Endothels, der Beschaffenheit der Basalmembran, dem effektiven Filtrationsdruck, von der Natur der filtrierten Substanzen und vom Konzentrationsgradienten ab (BARGMANN 1977). Gase und lipophile Stoffe können die Zellmembran direkt passieren. Es steht ihnen also die gesamte Oberfläche zur Verfügung. Wasser und hydrophile Stoffe dagegen müssen auf vorgezeichneten Wegen passieren (PAPPENHEIMER 1951):

- a) Die "kleinen" Poren (ca. 40 Å) erlauben die Passage von Wasser und kleinen lipophilen Molekülen. Die "großen" Poren (ca. 200-300 Å) ermöglichen den Durchtritt von größeren Molekülen, z.B. Proteinen (GABBIANI 1977).
- b) Die Interzellularspalten (bis 90 Å) sollen für Moleküle bis 1.7 nm permeabel sein (HAMMERSEN 1983).
- c) Der vesikuläre Transport (Zytopenmpsis) für Makromoleküle, wie z.B. Proteine (SPÖRRI 1976).

Beim vesikulären Transport wurden zwei verfeinerte Theorien entwickelt, und zwar

- der Transport durch einen ständigen Prozeß von Vesikelfusionen und -abschnürungen und so die Bildung von temporären Kanälen (CLOUGH 1983).
- die Bildung von flüchtigen, transendothelialen Passagewegen durch die Fusion von luminalen und basalen Inaginationen (FROKJAER-JENSEN 1983).

Insgesamt muß wohl die Vorstellung von festen, vorgegebenen Strukturen ersetzt werden durch ein "dynamisches, hydrophiles" System (HAMMERSEN 1983). Die Permeabilität ist eine Regelgröße.



1.3 Die Regulierung des Gefäßtonus

Die Muskulatur der Gefäße, besonders der kleinen, präkapillären Gefäße, ist reichlich sympathisch innerviert. Die vorwiegend marklosen Fasern verzweigen sich zwischen Adventitia und Media. Die von den Nervenendigungen abgegebenen Transmitter erreichen die Muskelzellen der Media durch Diffusion. Die weitere Ausbreitung der Impulse über die Muskelzellen geschieht über die "Tight Junctions" (GAUER 1972).

Es gibt adrenerge sympathische Nerven, die vasokonstriktorisch wirken und cholinerge, gefäßerweiternde sympathische Fasern (NICKEL 1976; SPÖRRI 1976). Es ist zweifelhaft, ob parasympathische Gefäßnerven vasodilatierend wirken. Die Gefäßdilatation ist vielmehr als eine Verminderung der Impulsfrequenz der Konstriktoren zu sehen. Weiterhin beeinflussen Hormone und Metabolite den Gefäßtonus. Gefäßerweiternde Wirkstoffe sind Acetylcholin, Histamin und Bradykinin. Vasopressin, Angiotensin II und Serotonin wirken konstriktorisch auf die Gefäße. Einen Doppeleffekt hat Noradrenalin, das an den meisten Gefäßen vasokonstriktorisch wirkt, jedoch die Herzkranzgefäße dilatiert. Nur in niedrigen Dosen dilatiert Noradrenalin auch Muskelgefäße. Ähnlich wie Adrenalin, das alpha- und beta-Rezeptoren erregen kann. Der konstringierende Effekt an den alpha-Rezeptoren ist jedoch stärker.

2. Pathophysiologie der Venen

Die Funktionen des venösen Systems sind die Blutspeicherung, die Blutmobilisation und die Blutleitung. Die Abstimmung von Tonus und Volumen sichert die Funktion dieses Systems ab.

Venenveränderungen können in dieses System gravierend eingreifen. Sie können durch morphologischen Umbau der Venen-

wand entstehen, oder sich reaktiv aus funktionellen Überlastungen entwickeln, wie z.B. durch erhöhten hydrostatischen Druck und überhöhten Innendruck bei zu langem Stehen oder falschem Sitzen. Zu geringer Gefäßtonus, Klappeninsuffizienzen und -störungen oder mangelhafte Betätigung der Muskelpumpe können Varizenbildung und Venenektasien zur Folge haben. Mangelhafter Druckabfall im venösen Teil der Endstrombahn führt konsekutiv zu vermehrter Filtration und zu Ödemen (SCHNEIDER und FISCHER 1969).

Nach Thrombosen der peripheren Venen kommt es ebenfalls zu einem Venendruckanstieg. Dadurch kommt es zu Schädigungen der Kapillarwände, zum Austritt von eiweißreicher Flüssigkeit und zu Ödemen. Zwar werden 80% der venösen Thrombosen rekanalisiert, aber es bleiben Wandunregelmäßigkeiten und Stenosen zurück. Auch werden die Venenklappen geschädigt und es entsteht das Bild der chronischen Veneninsuffizienz (RUDOFISKY 1982).

2.1 Der variköse Symptomenkomplex

Die Funktion der Venen erfordert eine bestimmte Weite der Gefäße, bestimmte Strömungsverhältnisse und bestimmte Strukturen der Wände. Dies alles unterliegt einem ständigen Stoffumsatz und Strukturwechsel.

Ändern sich Hämodynamik oder Stoffwechsel nachteilig, so entstehen pathologische Varianten wie Phlebektasien, Phlebosklerose und Varikosis. Als Phlebektasien bezeichnet man Venenerweiterungen ohne morphologisch nachweisbare Veränderungen. Die Phlebosklerose ist eine weitgehend gleichmäßige Venenwandverdickung.

Unter Varikosis versteht man den umschriebenen Umbau der Venenwand, so daß nur noch einzelne Muskelfasern und faserreiches, kollagenes Bindegewebe in Erscheinung treten. Häufige Lokalisation von Varizen sind die unteren Extremitäten, die inneren und äußeren Hämorrhoiden und die Öso-

phagusvarizen bei portaler Hypertension. Man unterscheidet die primären von den sekundären Varizen. Die primären Varizen treten häufig mit familiärer Disposition auf. Für die Varizenbildung wird eine genetisch bedingte Wandschwäche verantwortlich gemacht, die im Bereich der Klappen zu einer erheblichen Ausweitung und damit zur sekundären Klappeninsuffizienz führt.

Die sekundäre Varikose tritt im Gefolge des postthrombotischen Syndroms auf. Durch Organisation von Thromben kommt es zu Teilspernungen, aber auch zu bindegewebigen Verwachsungen der Klappen mit der Venenwand, so daß Blut durch insuffiziente oder klappenfreie Vv. communicantes in oberflächliche Venen absacken kann. Dadurch kommt es zur ungenügenden Blutabschöpfung und zu einem Rückstau bis in das Kapillargebiet (MÖRL 1986; HAMMERSEN 1985). Strukturuntersuchungen der Venenwand haben auf Grund von zahlreichen Befunden gezeigt, daß es bei der primären Varikose zu deutlichen Veränderungen der Mediamuskulzellen, sowie des Interstitiums der Varizenwand kommt. Es konnte eine Verminderung und Strukturveränderung des Kollagens bei gleichzeitiger Zunahme von Elastin und von Proteoglykanen in der extrazellulären Matrix nachgewiesen werden, mit Folgen für den Wassergehalt und die Permeabilität der Venenwand (WUPPERMANN 1986).

HAMMERSEN (1985) geht davon aus, daß die Varikose in der Mehrzahl der Fälle mit einer allgemeinen "Bindegewebsschwäche" einhergeht, wobei lysosomale Enzyme den Proteoglykanstoffwechsel und die Proteoglykanmaskierung des kollagenen Fasernetzes schädigen und so die normale Vernetzung des Kollagens auflösen. Das zu Gunsten des Mukopolysaccharidabbaus verschobene Gleichgewicht, der Verlust an Gitterbausteinen in der Venenwand und die Ablösung der Proteoglykane vom Kollagen vermindern die biochemischen Eigenschaften der Venenwand so entscheidend, daß dieser molekularbiologische Mechanismus wohl als eine der Haupt-

ursachen primärer und sekundärer Venenschäden anzusehen ist.

2.2 Die chronische Veneninsuffizienz

Die chronische Veneninsuffizienz wird durch Klappeninsuffizienz, -verklebungen und -verwachsungen der tiefen und oberflächlichen Venen verursacht. Da die Venenklappen ihre Funktion nicht mehr erfüllen, kommt es zu Blutreflux und Stase. Der Venendruck steigt und fällt auch bei Betätigung der Muskelpumpe nicht mehr genügend. Die Blutsäule lastet unvermindert auf dem Kapillarbereich, wodurch die Reabsorption vermindert wird und die Filtration das Übergewicht gewinnt. Die Lymphbahnen können dies auf die Dauer nicht kompensieren (SCHNEIDER und FISCHER 1969).

Der Eiweißgehalt im Gewebe steigt, Fibrin wird in das interstitielle Bindegewebe eingebaut und es entwickelt sich unter Zellschwund eine Induration (STÜNZI und WEISS 1982). Die Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff ist ebenso gestört wie seine Entsorgung (RUDOLFSKY 1982). Die chronische venöse Insuffizienz ist nach Klüken durch die folgenden Symptome charakterisiert:

Ödeme, Corona phlebectatica paraplantis, Ektasien größerer Venen, Ektasien intrakutaner Venen, Hypodermatitis, Dermatosklerose, De- und Hyperpigmentierung, Atrophie blanche, Ulcus cruris (KLÜKEN 1984).

2.3 Ödeme

Die Gesetzmäßigkeiten, nach denen der intravasale und interstitielle Flüssigkeitsraum geregelt ist, wurden schon von Starling in allgemein gültiger Form vorgelegt (STARLING 1886). Dem arteriellen Druck in den Kapillaren wirkt der interstitielle Druck im Gewebe entgegen. Ebenso ist der kolloidosmotische Druck in den Kapillaren und in der

interstitiellen Flüssigkeit entgegengesetzt gerichtet. Der postkapilläre, venöse Widerstand ist geringer als der arterielle Widerstand. Wegen dieser Differenz wird Flüssigkeit auf der arteriellen Seite filtriert und auf der venösen Seite wieder aufgenommen (STUMPE und KRÜCK 1970). Normalerweise herrscht zwischen den beiden Schenkeln ein Gleichgewicht. Dies setzt eine intakte Kapillarmembran voraus. Bei Veränderungen der Struktur und der Permeabilität kommt es zu einer Nettofiltration ins Gewebe und somit zu Ödemen.

Die pathologischen Mechanismen der Ödementstehung lassen sich in vier Gruppen einteilen:

- a) Ödeme infolge einer Erhöhung des hydrostatischen Druckes wie Stauungsödem, hämodynamische Ödeme
- b) Ödeme infolge von Kapillarwandschädigungen mit Permeabilitätssteigerung wie das morphologische Ödem (FELIX 1981), entzündliches Ödem, toxisches Ödem, allergisches Ödem und hormonelle Dysregulationen (Schilddrüse, Cushing usw.)
- c) Ödeme durch verminderte Eiweißkonzentration im Plasma wie bei nephrotischem Syndrom, Leberinsuffizienz, exsudativer Enteropathie, niedriger Eiweißzufuhr, Kachexie und Verbrennungen
- d) Ödeme infolge der Behinderung des Lymphabflusses
primär: A- oder Hypoplasie
sekundär: Entzündungen, Filariose, Tumore usw.

3. Therapeutische Maßnahmen

Es ergibt sich ganz von selbst aus der Vielzahl von Symptomen, Krankheitsvariationen und Lokalisationen, daß auch die angewendeten therapeutischen Maßnahmen eine ähnliche Breite einnehmen. Die Behandlung dieser unter dem Begriff "Venopathien" zusammengefaßten Symptomenkomplexe kann konservativ, chirurgisch oder medikamentös erfolgen. Häufig

werden die Behandlungsformen kombiniert.

Zu den konservativen Maßnahmen gehören Kompressionsverbände, straff-elastische Bandagen, Massagen, Bäder und Gymnastik. Alle diese Maßnahmen zielen auf eine Verbesserung des venösen Rückflusses. Zu den konservativen Maßnahmen gehört auch das aktive Beheben und Vermeiden von typischem Fehlverhalten, wie z.B. zu langes Stehen und falsches, abflußbehinderndes Sitzen. Ein weiterer positiver Effekt der konservativen Maßnahmen ist die Tatsache, daß sich der Patient aktiv an der Behandlung seiner Beschwerden beteiligen muß.

Zu den chirurgischen Maßnahmen gehören das Entfernen der varikös veränderten Venen, vor allem der oberflächlichen Venen (MÖRL 1986). Eine weitere Methode ist das Veröden (Sklerosierung) der Venen, wobei eine Gefäßwandschädigung hervorgerufen wird. Damit wird eine Thrombusbildung mit bindegewebiger Organisation und bleibender Obturation der betreffenden Gefäßstrecken erzielt (WIENERT 1984).

Für die medikamentöse Behandlung stehen zahlreiche Pharmaka mit unterschiedlichsten Inhaltsstoffen zur Verfügung. Antikoagulantien, Antiphlogistika, Diuretika, vasoaktive (venentonisierende) Mittel und die sogenannten ödemprotektiven Substanzen gehören dazu (FELIX 1986). Ödemprotektive Pharmaka, häufig auch als "Venenmittel" zusammengefaßt, beinhalten zumindest einen der folgenden Stoffe:

"pflanzliche Glykoside, hier vor allem Aescin (Roßkastanie), sowie eine Reihe von Flavonoiden (Rutin) und Steroidglykosiden (Ruscus), weiterhin synthetische Substanzen wie Benzaron und Tribenosid" (FELIX 1980).

Diese ödemprotektiven, oder auch antiexsudativen, Pharmaka, die bei Venenkranken am häufigsten verordnet werden, sollen im Gegensatz zu den Diuretika, welche Ödeme ausschwemmen, deren Entstehung von vorneherein hemmen bzw. verhindern. Sie werden zur Hemmung beider Ödemformen angewandt, sowohl beim rein hämodynamischen Ödem, bei dem ein

erhöhter Venendruck niedrigmolekulare Flüssigkeit ins Gewebe filtrierte, als auch beim morphologischen Ödem, bei dem die Kapillaren durch Schädigungen für Eiweiß durchlässig geworden sind (FELIX 1982 und 1986).

Zusammenfassend kann wohl gesagt werden, daß nur in leichten Fällen die medikamentöse Therapie, die häufig nur symptomatisch wirkt, für sich allein ausreicht. Eine Kombination mit konservativen Maßnahmen ist in den meisten Fällen besser.

4. O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside (HR)

Vor mehr als 50 Jahren vermutete die Arbeitsgruppe um den Nobelpreisträger Szent-Györgyi, daß das Fehlen von Flavonoiden für die Mangelkrankheit Skorbut mitverantwortlich sei (RUSZNYAK 1963). Die aus Zitronen- und Paprikaextrakten isolierte Substanz beeinflusste die Gefäßpermeabilität und wurde als "Vitamin P" bezeichnet. 1950 wurde die gesamte Stoffgruppe unter der Bezeichnung "Bioflavonoide" zusammengefaßt (LUTOMSKI 1982). Der Begriff "Vitamin P" wurde aus verschiedenen sachlichen Gründen wieder aufgegeben. Vor etwa 20 Jahren schafften halbsynthetische Abkömmlinge des Flavonoids Rutin die Basis für ein gut verträgliches Pharmakon, dessen Hauptindikation die Behandlung chronischer Veneninsuffizienzen ist.

4.1 Vorkommen

μ -Pyronderivate kommen in der Natur in pflanzlichem Gewebe als Glykoside und in freier Form vor. Meist treten sie in Blüten und Blättern auf, ebenso finden sie sich in Wurzeln, Citrusfrüchten und in Hölzern. Von allen sekundären Inhaltsstoffen sind sie im Pflanzenreich am weitesten verbreitet. Die Funktion der Flavonoide in der Pflanze ist

noch umstritten. Diskutiert werden u.a.:

Funktionen beim Befruchtungsprozeß, Schutzfunktionen gegen Infektionen, Beteiligung an Redoxreaktionen, Einfluß auf Wachstumsvorgänge.

Flavonoide Verbindungen können aus frischem und getrocknetem Pflanzenmaterial durch Extraktion gewonnen werden. Aufgrund seiner antiödematösen Wirkung ist ein großer Bedarf für Rutin vorhanden. Besonders hoch ist der Rutingehalt in den als Drogen verwendeten Schnurbaumknospen (*Sophorae Flos*, bis zu 25% Rutin) und im Buchweizen (*Fagopyri Herba*, bis zu 6% Rutin). Beide Pflanzen werden zur Herstellung von Rutin verwendet. Weiterhin ist Rutin, allerdings in geringerer Menge, im Gartenrautenkraut (*Rutae Herba*) und im Weißdorn (*Crataegi Flos und Folia*) enthalten (VOELTER 1983; LUTOMSKI 1972).

4.2 Chemie

Die Ableitung der Nomenklatur der Flavonoid-Grundstrukturen zeigt, daß sich das Benzo- γ -Pyron (Chromon) vom γ -Pyron ableitet. Bei weiterer Substitution durch einen Phenylkern in 2-Stellung kommt man zum Flavon. Die Bezeichnung der Atome und der aromatischen Ringe ist der Abbildung 1 zu entnehmen.

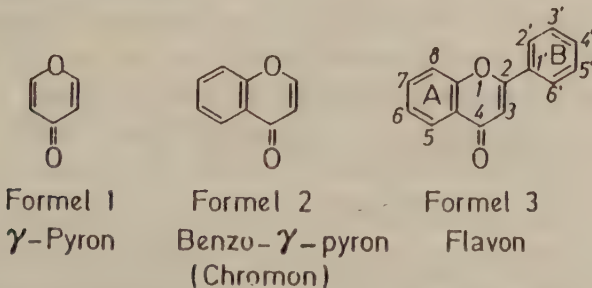


Abb.1: Strukturformeln von γ -Pyron (1), Benzo- γ -Pyron (2) und Flavon (3)

Bei der überwiegenden Zahl der Flavonoide liegt ein Grundskelett mit der Struktur C6-C3-C6 vor. Die Vielzahl der in der Natur vorkommenden Flavonoide erklärt sich u.a. aus der Möglichkeit, einzelne Wasserstoffatome der Kerne zu substituieren, wobei im Verlauf der Biosynthese eine Substitution durch OH-Gruppen erfolgt. Die OH-Gruppen können ihrerseits wieder glykosidische oder etherartige Bindungen eingehen. Als Zuckerkomponenten sind bisher überwiegend Glukose, Rhamnose, Galaktose und Rutinose (= Rhamnose + Glukose) gefunden worden (LUTOMSKI 1972). Aus der großen Gruppe der Flavonoide hat das Rutin wegen seiner therapeutischen Wirkung sehr große Bedeutung erlangt. Rutin ist das Rutinosid des Quercetins und somit das 5.7.3'.4'-Tetrahydroxyflavonol-3-rutinosid (Abb.2).

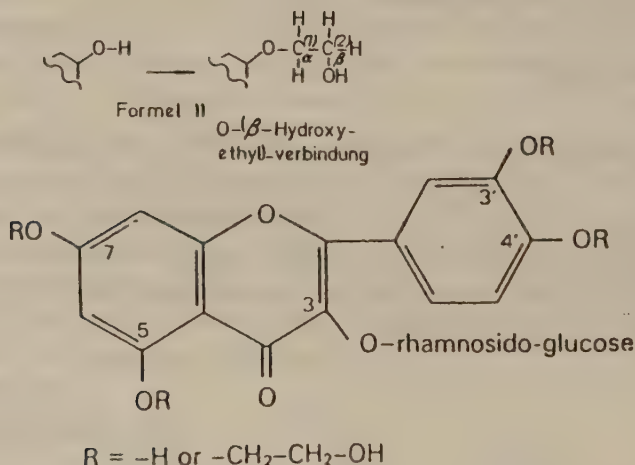


Abb.2: Strukturformel von Rutin bzw. HR

Vor circa zwanzig Jahren stellte die Zyma-Gruppe aus Rutin unter streng standartisierten Bedingungen durch Hydroxyethylierung mit Ethylenoxid ein Gemisch von Einzelstoffen her (SCHMIDT 1978). Es ist sehr gut wasserlöslich und hat ein durchschnittliches Molekulargewicht von etwa 750.

Dieses Gemisch, das unter dem Namen "Venoruton^R" im Handel bekannt ist, setzt sich wie folgt zusammen (COURBAT 1966; BALANT 1983):

7.3'.4'-Trihydroxyethylrutosid	50.1%
7.4'-Dihydroxyethylrutosid	21.9%
7.3'-Dihydroxyethylrutosid	11.7%
3'-Monohydroxyethylrutosid	7.3%
5.7.3'4'-Tetrahydroxyethylrutosid	5.1%
3.7.3'4'-Tetrahydroxyethylrutosid	3.4%
Rutin	0.5%

Um die Zusammensetzung von HR-Zyma und Troxerutin direkt vergleichen zu können, wurden beide Gemische durch HPLC aufgetrennt und die Anteile von Mono-, Di-, Tri- und Tetrahydroxyethylrutosiden in Prozent berechnet. "Troxerutin" ist danach keineswegs identisch mit "O- β -HR"-Zyma (Venoruton^R), sondern ist ebenfalls ein Substanzgemisch, jedoch mit anderer Zusammensetzung. Es besteht hauptsächlich aus Tri- und Tetrahydroxyethylrutosiden. (SCHMIDT 1978; eig. Ergebnisse).

4.3 Pharmakokinetik

a) orale Applikation

Zahlreiche Arbeiten befassen sich mit der Pharmakokinetik der Rutoside. Dabei muß auf die Tatsache hingewiesen werden, daß es sich um ein Substanzgemisch handelt. Daraus resultiert das Dilemma der pharmakokinetischen Untersuchungen. Sollen Einzelbestandteile verfolgt werden, oder Gesamtaktivitäten? Auf Grund der zahlreichen Arbeiten kann hier nur eine kurze Zusammenfassung gegeben werden mit einer Auswahl an Literaturstellen.

Obwohl die O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside wegen ihrer hohen Wasserlöslichkeit und wegen ihres durchschnittlichen Molekulargewichts von 750 Dalton eine enterale Resorption kaum erwarten lassen, konnten doch zahlreiche Autoren eine sol-

che zweifelsfrei nachweisen. Die häufig mit C^{14} -markierten Substanzen durchgeführten Untersuchungen zeigten eine Abnahme der Resorption mit steigendem Grad der Hydroxyethylierung. Auch Felix geht bei oraler Applikation von einer Absorptionsquote von 10% aus. Seiner Meinung nach könnte die Absorptionsquote bei niedrigen Dosen höher sein als bei hohen, wobei er als Ursache hierfür einen aktiven Transportmechanismus mit begrenzter Kapazität zur Diskussion stellt. Schon eine Stunde nach oraler Applikation konnten wirksame Serumspiegel nachgewiesen werden, die bis zu 120 Stunden nach Applikation nachweisbar blieben. Nach Hackett sind 30% der O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside im Blut an Plasmaproteine gebunden.

Nach oraler Applikation wird ein großer Teil der Rutoside von der Leber aufgenommen, dort glucuronidiert und via Galle in den Darm ausgeschieden. Diese biliäre Exkretion stellt nach oraler Aufnahme den wichtigsten Ausscheidungsmechanismus dar. Ungefähr 10% der so ausgeschiedenen O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside durchlaufen einen enterohepatischen Kreislauf. Die restlichen O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside werden zum Aglykon gespalten und mit dem Kot ausgeschieden.

Die renale Elimination spielt bei der oralen Applikation eine nachgeordnete Rolle. Je nach Autor kann man den über den Harn ausgeschiedenen Anteil einer einmaligen oralen Dosis mit 3-6% abschätzen. Die renale Eliminationshalbwertszeit beträgt nach Balant 18-26 Stunden. Die O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside scheinen den eigenen Stoffwechsel weder durch Enzymhemmung, noch durch Enzyminduktion, zu beeinflussen. Die lange Nachweisbarkeit der O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside im Blut sowie die lange Eliminationszeit über die Nieren weisen auf eine Retinierung der Stoffe im Gewebe hin. Felix konnte zeigen, daß die Rutoside den Kreislauf zum Teil verlassen und an der glatten Gefäß- und

Darmmuskulatur einen schützenden Effekt ausüben. (BARROW 1974; FÖRSTER 1978; MIKROVITSCH 1973; JUNG 1977; FELIX 1980 und 1983; HACKETT 1976 und 1977 a und b; BALANT 1983)

b) parenterale Applikation

Bei der intravenösen Applikation verschwinden die O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside sehr viel schneller wieder aus dem Plasma als bei der oralen Aufnahme. Einem steilen Anstieg des Serumspegels mit Maximalwerten bis zur 30. Minute folgt eine exponentielle Abnahme. Nach maximal vier Stunden ist der Hauptteil wieder eliminiert. Zwar stellt auch hierbei die biliäre Ausscheidung den Hauptweg dar, jedoch sind die Nieren verstärkt beteiligt. Dabei wird Tetrahydroxyethylrutosid mehr renal, Monohydroxyethylrutosid mehr biliär ausgeschieden. Förster zeigte beim Menschen, daß bei intravenöser Dauerinfusion mit steigender Dosis die renale Ausscheidung zunimmt.

Dieses Ergebnis läßt eine chronisch orale Applikation besonders aussichtsreich erscheinen. Die langsame Resorption aus dem Darm läßt im Serum nur niedrige Spiegel entstehen, so daß die renale Ausscheidung gering bleibt und so sehr viel von den Substanzen ins Gewebe übertreten können. Dies würde bedeuten, daß der Übertritt ins Gewebe weniger konzentrationsabhängig ist als die renale Ausscheidung. (FELIX 1983; FÖRSTER 1978; HACKETT 1977 a und b).

4.4 Toxizität und Nebenwirkungen

Eine Reihe von Autoren hat sich mit dem Problem der Toxizität der Flavonoide befaßt. Es konnten keine toxischen Wirkungen sowohl nach einmaliger Gabe großer Dosen als auch bei langdauernder Verabreichung nachgewiesen werden. Eine toxische Wirkung wurde nur bei Ratten nach zweimaliger oraler Gabe von 400mg 7-Hydroxyflavanon und eine Ver-

ringerung des Körpergewichts nach der Verabreichung einer 1% Chalkon enthaltenden Diät während einer Woche beobachtet. Es wurde festgestellt, daß die Gruppierung $-CO-C=C-O$ im Pyronring, die in allen Flavonen und Flavonolen vorkommt, eine Toxophorgruppe darstellt. Allerdings nicht bei Warmblütern, sondern nur bei Fischen. Auf Grund der bisherigen Untersuchungsergebnisse ergibt sich, daß Flavonoid-Verbindungen darstellen, die für Menschen und höhere Tiere nicht toxisch sind.

Besonders die O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside (HR) haben sich in allen Phasen der klinischen Versuche als eine sehr gut verträgliche Substanz erwiesen. (BALANT 1983; LUTOMSKI 1972; FIELD 1949; BÖHM 1959 und 1960)

4.5 Pharmakodynamik

Die wesentlichste pharmakologische Wirkung der O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside ist die Verminderung der Permeabilität im Bereich der Kapillaren und Venulen, die sich in der Rückbildung verschiedener experimentell erzeugter Ödeme zeigt. Daher auch ihre Anwendung bei chronischer Veneninsuffizienz, Varikosis, posttraumatischen Ödemen usw.

Der gefäßschützende Effekt der O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside wurde in zahlreichen Arbeiten untersucht:

- Ödemerzeugung durch kapillarschädigende bzw. entzündungserzeugende Substanzen (GABOR 1978; VAN CAUWENBERGER 1967)
- Dextran- und Phospholipase-Ödem (HAMMERSEN 1970)
- Rattenschwanzödem (venöse Stase) (LUND 1970; GLOOR 1974; NORDMANN 1967)
- Ödem durch Hitze (PILLER 1977)
- Strahleninduziertes Ödem (KLEMM 1978)

Die weitergehende Schutzwirkung bei Strahlenschäden wurde ebenfalls an verschiedenen Modellen untersucht, u.a. von (FRITZ-NIGGLI 1978 und 1983; WURST 1978; KLEMM 1970 und 1978; HARMS 1964).

Auch eine günstige Beeinflussung der Fließeigenschaften des Blutes, der Thrombozyten- und Erythrozytenaggregation und der Hämolyse konnte gezeigt werden (GOLDEN 1978; SCHMID-SCHÖNBEIN 1975; KIESEWETTER 1983; BÄCHMANN 1983; BIESENDORFER 1981).

Der Gewebeschutz der O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside wurde von FELIX (1983) an isolierten Gefäß- und Darmabschnitten bei invitro-Versuchen untersucht. Die Schädigung wurde dabei durch Etacrynsäure bzw. Polidocanol erzeugt. Beim Überschreiten einer "optimalen" Konzentration wurden die Effekte allerdings wieder schwächer. Außerdem konnte gezeigt werden, daß sich das Flavonoid bei chronisch oraler Gabe besser im Gewebe verankerte als bei Gabe über die Nährlösung. Felix untersuchte auch die Wirkung der O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside auf den Flüssigkeitsaustausch in der terminalen Strombahn am Hinterlauf der Katze.

4.6 Zum Wirkungsmechanismus von HR

Die protektiven Wirkungen der O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside könnten durch unspezifische Effekte ausgeübt werden, wobei sich die Unspezifität sowohl auf die auslösenden Noxen als auch auf die zu schützenden Strukturen bezieht. Es konnte gegen verschiedenste Noxen, wie entzündliche oder nicht-entzündliche Ödeme, Strahlung, Hitze und Stauung, eine protektive Wirkung nachgewiesen werden. Diese Schutzwirkung war sowohl an Blutgefäßen als auch an der glatten Muskulatur des Darmes von Meerschweinchen wirksam. Felix schließt einen indirekten Effekt über eine Kreislaufwirkung aus. Nicht ausgeschlossen werden kann eine indirekte

Wirkung über eine Aktivierung oder Inaktivierung einer Substanz im strömenden Blut (FELIX 1983).

Die Flavonoide hindern vermutlich die Wirkung der Substanzen, die bei den verschiedenen Ödemformen für die erhöhte Kapillardurchlässigkeit verantwortlich sind. Möglicherweise greifen die O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside direkt an der terminalen Strombahn an, indem sie das Lumen der Endothelporen verengen oder verschließen (FELIX 1970 und 1972), die Bindungen zwischen den Endothelzellen verstärken (CASLEY-SMITH 1976), die Konsistenz der endothelialen Kittsubstanz beeinflussen (HLADOVEC 1977) oder einen Effekt auf die Basalmembran und das interstitielle Bindegewebe ausüben (CASLEY-SMITH 1976).

HAMMERSEN (1978) nimmt an, daß die Wirksamkeit der O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside auf einem protektiven, stabilisierenden Membraneffekt beruht. An verschiedenen Ödemmodellen (Dextran, Phospholipase) überprüfte er elektronenmikroskopisch, ob die schützenden Eigenschaften der O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside auch ein strukturelles Äquivalent in der terminalen Strombahn besitzen. In allen vorliegenden Untersuchungen verhinderte HR sowohl die Ausbildung endothelialer Zytoplasmavortreibungen, als auch den Anstieg der Vesikulation und Vakuolation des Endothels. Beim Phospholipase-Ödem wurde die Entstehung der Stechapfelform der Erythrozyten gebremst und in beiden Ödemformen wurde die Zahl der interendothelialen Lücken (Gaps) beträchtlich reduziert.

Beim nichtentzündlichen Etacrynsäureödem treten folgende Befunde auf:

1. Zahlreiche Gefäßverschlüsse durch Thrombozytenaggregate
2. Eine starke Abflachung des Endothels mit Ausbildung tiefer Invaginationen der luminalen Zellmembran
3. Auftreten zahlreicher lumenwärts gerichteter, blasiger Endothelprotuberanzen

Es ergab sich bei allen drei Veränderungen ein deutlich positiver Effekt der O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside auf weniger als die Hälfte. Die Befunde sprechen für eine Bindung des HR an die Zellmembranen, an denen es dann eine protektive Wirkung ausübt (HAMMERSEN 1978 und 1983).

Auch GOLDEN (1978) kommt auf Grund übereinstimmender Ergebnisse zu der Ansicht, daß die O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside die Fähigkeit besitzen, Aggregationen zu verhindern. Dieser Membranschutz und diese Aggregationshemmung würde auch die bessere Verformbarkeit (SCHMID-SCHÖNBEIN 1975 und 1978) der Erythrozyten unter Laktazidose und die verbesserten Fließeigenschaften des Blutes (KIESEWETTER 1983; BÄCHMANN 1983) unter pathologischen Bedingungen erklären. Aus der unterschiedlichen Wirkung der O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside auf gesunde und maligne Zellen bei der strahleninduzierten Tumorregression leitet FRITZ-NIGGLI 1978 und 1983 eine Schutzwirkung dieser Substanzen auf membrangebundene Enzymsysteme und Zellbestandteile ab. Die Flavonoide scheinen die Permeabilität der Mitochondrienmembran zu stabilisieren und dadurch Störungen des intrazellulären Energiestoffwechsels zu verhindern. Dadurch wird für die Aufrechterhaltung eines normalen Energie-Pools in den Zellen gesorgt, was für die Erholung strahlengeschädigter Zellen wichtig ist.

Eine ebenfalls indirekte antiödematöse Wirkung könnte aus der Fähigkeit der Flavonoide resultieren, die Wirkung der Katecholamine zu verstärken, wobei eine Hemmwirkung auf die Katechol-O-Methyltransferase diskutiert wird. Durch diese Verstärkung der Katecholwirkung kann es zu lokalen Konstriktionen der Widerstandsgefäße kommen. Dadurch wird der effektive Filtrationsdruck vermindert, Flüssigkeit in das Gefäßlumen absorbiert und die Stoffaustauschfläche vermindert (AMBROSE und DeEDS 1949; GUGLER und DENGLER 1973; FELIX und REMIEN 1974).

Ein direkter vasoaktiver Einfluß der Flavonoide gilt als unwahrscheinlich. Sowohl konstriktorische als auch dilatatorische Effekte wurden beobachtet. Möglicherweise bewirken die O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside auch eine Stimulierung der Nebennierenrinde. Denn nach HR-Gabe steigt der Steroidplasmaspiegel an. Dies findet sich bei adrenoektomierten Tieren nicht (GABOR 1978). Auch die Rattenpfortenödeme werden durch HR nur gehemmt, wenn die Tiere eine Nebenniere besitzen (VAN CAUWENBERGER 1967).

CASLEY-SMITH (1976) beschreibt als Wirkungsmechanismus, daß die O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside die Permeabilität der Blutkapillaren erhöhen. Dies wird überkompensiert durch die Fähigkeit der Benzo-Pyrone, Makrophagen zu erhöhter Proteolysetätigkeit anzuregen. Dadurch können die ins Gewebe übergetretenengroßen Eiweißmoleküle in kleinere Teile zerlegt werden. Für diese besteht ein Konzentrationsgradient in Richtung Blutgefäßlumen und ein größerer Diffusionskoeffizient, so daß sie besser eliminiert werden können. Durch diesen Mechanismus ist nicht nur ein ödemprotektiver Effekt, sondern auch bei schon existierendem Ödem ein positiver Effekt zu erwarten.

5 Etacrynsäure

Etacrynsäure gehört als Pharmakon zur Gruppe der stark wirksamen, wasser- und salzausscheidenden Diuretika. Etacrynsäure ist ein ungesättigtes Ketoderivat der Aryloxyessigsäure.

OBERMAYR (1984) hat in ihren Versuchen zur Schädigung der glatten Muskulatur der isolierten Pfortader der Ratte Etacrynsäure in einer Konzentration von 0.01% fünfzehn Minuten lang auf die Gefäße einwirken lassen. Dadurch wurde die normalerweise auftretende Verkürzung der Organpräparate nach Noradrenalineinwirkung von 5-15% auf 0-2% reduziert.

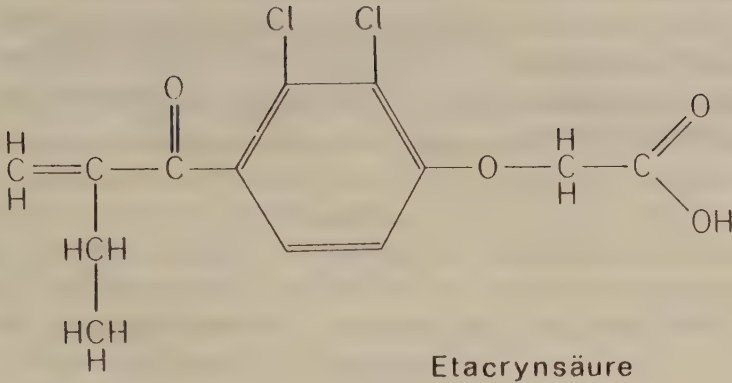


Abb.3: Strukturformel der Etacrynsäure

NIEBERLE (1986) hat die Etacrynsäure 0.01% für 10 Minuten einwirken lassen. Bei seinen Versuchen zeigte sich, daß die durch Etacrynsäure verursachte Schädigung irreversibel war, d.h. nicht auswaschbar war. Die nachgewiesene Schutzwirkung von HR war bei intravasaler Gabe ebenfalls in kurzer Zeit auswaschbar, bei oraler Gabe vor Entnahme der Gefäße jedoch signifikant vorhanden.

In den Untersuchungen von BAUER (1987) hat Etacrynsäure einen deutlich schädigenden Einfluß sowohl auf die glatte Muskulatur, als auch auf das Endothel ausgeübt. Im Unterschied zur Schädigung mit Polidocanol ist festzustellen, daß Etacrynsäure auch bei extravasaler Gabe, trotz eines Druckgefälles, gut durch die Gefäßwand eindringt und die Muskulatur und das Endothel schädigt.

Die Morphologie der Etacrynsäureschädigung wurde von HAMMERSEN (1983) elektronenmikroskopisch untersucht. Dabei ergab sich eine starke Abflachung des Endothels mit Ausbildung tiefer Invaginationen der luminalen Zellmembran,

zahlreiche Gefäßverschlüsse durch Thrombozytenaggregate und lumenwärts gerichtete, blasige Endothelprotuberanzen. Die Zellfugen waren stets geschlossen. Dadurch wird die Diffusionsstrecke generell verkleinert und die Wahrscheinlichkeit zu Verschmelzungen von Vesikeln zu transendothelialen Kanälen größer.

III. METHODIK

1. Versuche an isolierten Ohrrendvenen

Für die in-vitro-Versuche wurde die Vena auricularis lateralis des Schweines verwendet. Sie stammten von weiblichen und männlich-kastrierten Schlachtschweinen mit einem Gewicht von 100 bis 120 Kilogramm.

Die Schweine werden am Schlachthof elektrisch betäubt. Nach dem Entbluten wird das Ohr am Ohrgrund abgetrennt, unter fließendem Wasser gereinigt und möglichst schnell ins Labor zur Präparation verbracht.

1.1 Präparation

Die gesäuberten Ohren werden auf einer Arbeitsplatte fixiert. Die noch mit geringen Mengen Blut gefüllten Ohrrendvenen sind durch die Haut gut sichtbar. In der Nähe der Ohrbasis entfernt man ein ca. 3 x 6 cm großes Stück der Haut. Mit Skalpell und Pinzette entfernt man subkutanes Bindegewebe und Fett. An dem freigelegten Venenstück werden alle Seitenabgänge mit Seidenfaden abgebunden und die Vene an zwei Stellen durch einen vorsichtigen Scherenschlag geöffnet. In jede dieser Öffnungen wird eine Kanüle, 0,9 mm Außendurchmesser, eingeschoben und mit einem Faden fixiert. Nun werden die kanülierten Venen aus dem Ohr herausgetrennt, mit Krebs-Ringer-Lösung von Blut freigespült und dabei gleichzeitig geprüft, ob die Seitenabgänge dicht sind.

Die so isolierten Venen werden in ihrer natürlichen Länge auf eine spezielle Halterung gesteckt. Dabei ist darauf zu achten, daß die spätere Fließrichtung der Krebs-Ringer-Lösung mit der natürlichen Fließrichtung des Blutes übereinstimmt (Venenklappen!). Die Gefäße werden mit 6 g vorgespannt und in ein auf 37°C beheiztes Organbad mit

Krebs-Ringer-Lösung gebracht. Dieses Organbad faßt 22 ml und kann aus einem Vorratsbehälter mit frischer, vorgewärmter Lösung gespült werden. Die Krebs-Ringer-Lösung wird kontinuierlich mit Carbogen begast. Die auf diese Weise präparierten Venenstücke sind ungefähr 2-3 cm lang.

1.2 Perfusionstechnik

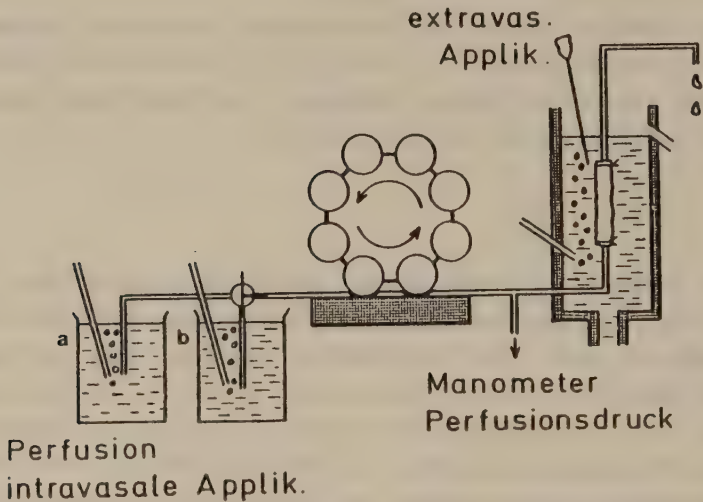


Abb.4: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur strömungskonstanten Perfusion isolierter Ohrrendvenen

Für die intravasale Perfusion wird ein PVC-Schlauch von einem Becherglas (a) über eine Rollenpumpe zum distalen Ende der isolierten Vene geführt. Eine Abzweigung des Schlauches führt in ein zweites Becherglas (b), über das nach entsprechendem Abklemmen der Schläuche Pharmakalösungen appliziert werden können. Die Pumpe erzeugt eine konstante Strömung von 2 ml/min. Ein weiterer Abgang am Schlauch zwischen Perfusionspumpe und Vene führt zu einem Manometer zur Messung des Perfusionsdruckes.

Da die Venen mit einem konstanten Volumen perfundiert werden, führt eine Kontraktion der Venen zu einer Erhöhung des Perfusionsdruckes. Diese Druckänderungen werden auf einem Mehrkanalschreiber fortlaufend registriert. Diese Methode ermöglicht im Gegensatz zu der oft angewandten Methode mit schraubenförmig aufgeschnittenen Gefäßen eine Trennung von intravasaler und extravasaler Applikationsform. Das Endothel der Gefäße bleibt unversehrt (DE LA LANDE 1965).

1.3 Versuchsablauf

Während der Präparation werden die schon fertigen Gefäße im Organbad mit geringer Strömung perfundiert. In dieser Zeit (ca. 1 Stunde) können sie sich an das in-vitro-Milieu anpassen. Nachdem insgesamt vier Gefäße präpariert sind, beginnt der eigentliche Versuch. Es werden nun die in dem jeweiligen Versuch verwendeten Substanzen appliziert. Die Versuchsreihen verlaufen im Prinzip immer nach dem selben Schema ab:

Vor und nach der Gefäßschädigung wird die Reaktivität der Venen durch jeweils intra- und extravasale Applikation von 10^{-7} - und 10^{-6} -molarer Adrenalinlösung geprüft. Die durch das Adrenalin hervorgerufene Kontraktion dient als Maß für den Zustand der Muskelzellen.

Das Adrenalin wird jeweils so lange verabreicht, bis eine für die jeweilige Konzentration maximale Gefäßkontraktion (Plateau) erreicht ist. Anschließend wird durch intravasale Perfusion oder Spülen des Organbades mit Krebs-Ringer-Lösung das Adrenalin quantitativ wieder entfernt, d.h. so lange gespült, bis der Ausgangsdruck wieder erreicht ist. Diesem schematischen Grundablauf aller Versuchsserien überlagern sich jeweils die eigentlichen Versuchsprogramme der einzelnen Serien, wie sie im Folgenden beschrieben werden:

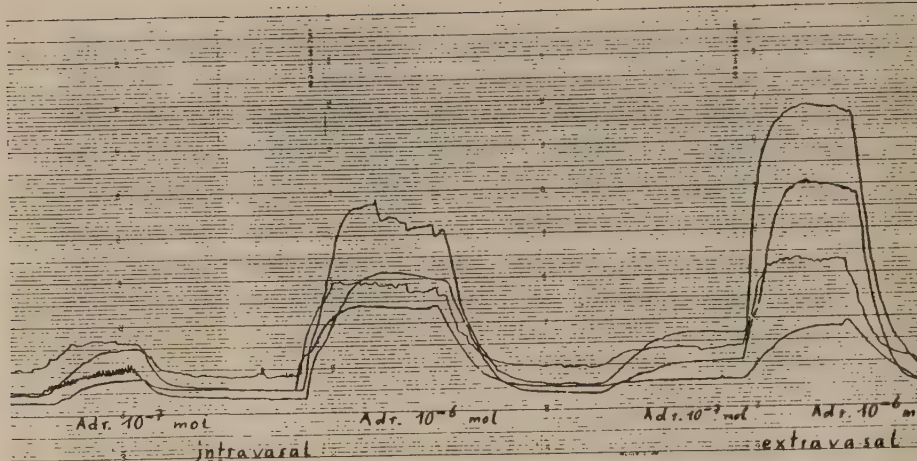


Abb.5: Darstellung des Originalkurvenverlaufs

a) Schädigung der Gefäße in Abhängigkeit von der Einwirkzeit der Etacrynsäure 0,1%

- keine Schädigung

- 2.5 min Etacrynsäure 0.1% intravasal

- 5 min Etacrynsäure 0.1% intravasal

- 7.5 min Etacrynsäure 0.1% intravasal

- 10 min Etacrynsäure 0.1% intravasal

b) Schädigung der Gefäße immer durch 7.5 min lange Perfusion mit Etacrynsäure 0.1% intravasal

- HR wird 20 min lang direkt vor Beginn der Schädigung intravasal gegeben

- HR wird 12.5 min lang direkt vor Beginn der Schädigung und 7.5 min lang zusammen mit Etacrynsäure 0.1%, also insgesamt 20 min lang, gegeben

- HR wird 20 min lang direkt vor Beginn der Schädigung extravasal gegeben

- HR wird von Beginn des Versuchs (ca. 1 Stunde vor der Schädigung) bis zu seinem Ende intra- und extravasal gegeben, also auch während der Schädigung

- c) Schädigung der Gefäße immer durch 2.5 min lange Perfusion mit Etacrynsäure 0.1% intravasal
- HR wird von Beginn des Versuchs (ca. 1 Stunde vor der Schädigung) bis zu seinem Ende intravasal gegeben, also auch während der Schädigung
 - HR wird von Beginn des Versuchs (ca. 1 Stunde vor der Schädigung) bis zu seinem Ende extravasal gegeben, also auch während der Schädigung
 - HR wird von Beginn des Versuchs (ca. 1 Stunde vor der Schädigung) bis zu seinem Ende intra- und extravasal gegeben, also auch während der Schädigung
- d) Schädigung der Gefäße immer durch 2.5 min lange Perfusion mit Etacrynsäure 0.1% intravasal
- Troxerutin wird von Beginn des Versuchs (ca. 1 Stunde vor der Schädigung) bis zu seinem Ende intravasal gegeben, also auch während der Schädigung
 - Troxerutin wird von Beginn des Versuchs (ca. 1 Stunde vor der Schädigung) bis zu seinem Ende extravasal gegeben, also auch während der Schädigung
 - Troxerutin wird von Beginn des Versuchs (ca. 1 Stunde vor der Schädigung) bis zu seinem Ende intra- und extravasal gegeben, also auch während der Schädigung
- e) Versuche zur Eigenwirkung von HR und Troxerutin. Die Gefäße werden nicht geschädigt. Ansonsten wurde strikt der übliche Versuchsablauf eingehalten, besonders auch was den zeitlichen Rahmen betrifft. Die Adrenalinreaktionen bei diesen Bedingungen werden dann mit denen bei reiner Krebslösungsperfusion verglichen.

1.4 Auswertung der Meßdaten

In den vom Mehrkanalschreiber aufgezeichneten Kurven wird das Maximum der Gefäßkonstriktion nach Adrenalin in mm Hg ermittelt. Das Maximum ist der Differenzbetrag zwischen dem höchsten Wert des Perfusionsdruckes (Plateau) und dem

Ausgangswert vor der Gefäßreaktion. Jeweils die Werte der intravasalen Reaktion vor und nach der Schädigung mit Etacrynsäure werden in der statistischen Auswertung miteinander verglichen, wobei die Ausgangsreaktion immer als 100% gesetzt wird. Ebenso wird mit den extravasalen Reaktionen verfahren.

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wird der Student-t-Test zum Vergleich zweier Mittelwerte angewendet. In den Versuchen, in denen die Versuchspräparate ihre eigene Kontrolle darstellen, können die Ergebnisse mit Hilfe des gepaarten t-Tests geprüft werden (CLAUS und EBNER 1975).

Signifikanz ist gegeben bei:

$p < 0.05$	*	(in den Tabellen)
$p < 0.01$	**	
$p < 0.001$	***	

Der mittlere Fehler des Mittelwertes (Standarterror) wird nach folgender Formel berechnet:

$$s^E = \frac{s^A}{\sqrt{n}}$$

s^E = Standartabweichung des Mittelwertes

s^A = Standartabweichung in der Grundgesamtheit

n = Anzahl der Einzelwerte

1.5 Diskussion der Methodik

Diese Versuchsanordnung zur Gefäßperfusion entspricht im Vergleich zu den häufig angewandten schraubenförmigen Gefäßstreifen eher den physiologischen Verhältnissen. Das Endothel wird bei dieser Präparation nicht geschädigt, was durch die Acetylcholin-Reaktion nachgewiesen werden kann. Außerdem hat man einen getrennten intravasalen und extravasalen Raum.

Da es sich bei der Krebs-Ringer-Lösung um eine homogene, Newton'sche Flüssigkeit handelt, sich die Länge der Gefäße während des Versuchs nicht ändert und bei den beschriebenen Bedingungen ein offenes System vorliegt, ist es berechtigt, das Hagen-Poiseuille'sche Gesetz anzuwenden (GAUER 1972; RIEGER 1981):

$$\Delta P = J \times \frac{8}{\pi} \times \eta \times \frac{l}{\Delta r^4}$$

J = Stromstärke, η = Viskosität der Krebs-Ringer-Lösung,
l = Gefäßlänge, Δr = Radius des Gefäßlumens,

ΔP = Änderung des Perfusionsdruckes

Hieraus ist ersichtlich, daß bei konstanter Stromstärke, konstanter Gefäßlänge und Viskosität der Spülflüssigkeit sich eine Änderung des Gefäßlumens in der 4. Potenz auf den Perfusionsdruck auswirkt und dieser somit sehr gut als Indikator für Änderungen des Gefäßtonus geeignet ist.

1.6 HPLC-Trennung

Für die HPLC-Trennung wurde jeweils ein Aliquot aus der Ampulle HR bzw. Troxerutin (Gehalt jeweils 500 mg/ 5 ml) 1:2000 verdünnt. Für die Messung stand ein Gerät der Firma Spectra-Physiks zur Verfügung, das mit einem Gradientenmischer, einem Integrator und einer UV-Einheit ausgerüstet war. Es wurde eine Fertigsäule RP-8 (250x4 mm) der Firma Bischoff verwendet. Das Laufmittel war ein Gemisch von Wasser/Methanol/Essigsäure im Verhältnis 70/30/6. Die Fließgeschwindigkeit war 0,9 ml/min. Die Detektion der eluierten Substanzen erfolgte bei 256 nm.

1.7 Geräte und Substanzen

- Servogor Mehrkanalschreiber 960, Fa. BBC Goerz
- Perfusionspumpe Ismatec ip-4, Zürich
- Computer Commodore CBM 8032
- Spectra-Physics HPLC SP 8700
- Spectra-Physics Gradientenmischer SP 8700
- UV-Detektor HP 1040 A
- HP Chem-Station
- Etacrynsäure (Hydromedin^R), MSD-Pharma
- Adrenalin-Lösung 1:1000 (Suprarenin^R) Hoechst AG
- O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside (Venoruton^R) Zyma, München
- Troxerutin, TA-A1, Merck
- Krebs-Ringer-Lösung (DE MEY und VANHOUTTE 1980):

6.91 g NaCl

0.35 g KCl

0.144 g MgSO₄

0.296 g MgSO₄ x 7 H₂O

0.163 g KH₂PO₄

0.277 g CaCl₂

2.1 g NaHCO₃

2.2 g Glucose

0.055 g Pyruvat

0.026 g Ca-EDTA

ad 1 l Aqua bidest, Chemikalien Merck p.a.

IV. ERGEBNISSE

1. Protektive Wirkungen von O-(β -Hydroxyethyl)-rutosiden an isolierten Schweineohrrandvenen

Es sollte untersucht werden, ob O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside in der Lage sind, auch beim in-vitro-Modell der isolierten Vena auricularis lateralis des Schweines die schädigende Wirkung von Etacrynsäure abzuschwächen. Eine Perfusion dieser Gefäßpräparate mit 0.1%-iger Etacrynsäurelösung (Hydromedin^R in Krebs-Ringer-Lösung gelöst) über verschiedene Zeiträume sollte die Gefäßintima schädigen. Es sollte die Zeitabhängigkeit der Schädigung dargestellt werden. Bei den isolierten Gefäßen erzeugt Etacrynsäure nicht nur eine Endothelschädigung, sondern sie gelangt auch zu der glatten Muskulatur der Gefäße. Das Ausmaß dieser Schädigungen wurde zuerst in den Kontrollversuchen bei gleichbleibender Konzentration des Schädigungsmittels, jedoch in Abhängigkeit von der Einwirkzeit, ermittelt. Als Indikator diente die Stärke des Druckanstiegs (= Gefäßkontraktion, siehe Methodik) nach der Applikation von Adrenalin.

Bei den einzelnen Versuchen wurde in zeitlich immer etwa gleichen Abständen sowohl vor als auch nach der Etacrynsäureperfusion das Adrenalin nach folgendem Schema verabreicht: Adrenalin 10^{-7} molar intravasal, Adrenalin 10^{-6} molar intravasal, Adrenalin 10^{-7} molar extravasal, Adrenalin 10^{-6} molar extravasal. Die Gabe von Adrenalin dauerte jeweils so lange, bis die Gefäßabschnitte keine weitere Tonuszunahme mehr zeigten, d.h. ein Plateau erreicht hatten. Anschließend wurde es durch Spülen mit Krebs-Ringer-Lösung rasch wieder aus dem System entfernt, bis das Ausgangsniveau wieder erreicht war. Ausgewertet wurde jeweils nur die Reaktion auf die 10^{-6} -molare Adrenalingabe, und zwar die Maximalwerte. Der Vergleich dieser Werte vor und

nach der Gefäßschädigung in Prozenten der Ausgangswerte (vor der Schädigung) zeigte das Ausmaß der Schädigung an. Die Verumversuche wurden in der gleichen Weise durchgeführt, nur mit dem Unterschied, daß, je nach Versuch, vor oder während der Etacrynsäureperfusion die isolierten Venen mit HR oder Troxerutin behandelt wurden. Ein Vergleich der Ergebnisse aus den Kontrollversuchen mit denen der Verumversuche zeigte dann, ob und in welchem Ausmaß ein Gefäßschutz durch die Rutoside erfolgt war.

1.1 Abhängigkeit der Schädigung mit Etacrynsäure 0.1% von der Einwirkzeit (Kontrollversuche).

Bei diesen Versuchen wurden die Gefäße wie in der Methodik beschrieben vorbereitet und nur mit Krebs-Ringer-Lösung perfundiert. Nach dem ersten "Adrenalin-Durchgang" wurde, je nach Versuch, Etacrynsäure 0.1%-ig, in Krebs-Ringer-Lösung gelöst, für 2.5 min, 5 min, 7.5 min und 10 min gegeben. Die jeweilige Anzahl an Gefäßen pro Serie ist den Tabellen 1 und 2, sowie den Abbildungen 6,7,8 zu entnehmen. Die besonders interessierenden Serien 2.5 min und 7.5 min wurden durch hohe Gefäßzahlen abgesichert. Die zahlreichen Versuche lassen eine klare Abhängigkeit der Kontraktilität von der Dauer der Schädigung erkennen. So lag nach 7.5-minütiger Perfusion das Maximum der 10^{-6} -molaren Adrenalinreaktion unter 20% der Ausgangswerte und somit im Streubereich des Standarderrors. Obwohl die Etacrynsäure immer nur von der intimalen Gefäßseite gegeben wurde, war die Reaktion des Gefäßes bei der extravasalen Adrenalinreaktion etwas schwächer (intravasal = 56.46%, extravasal = 40.65%) ausgeprägt.

Tab.1 : Einfluß einer zeitlich unterschiedlich langen Einwirkung von Etacrynsäure 0.1% auf die durch intravasal appliziertes Adrenalin hervorgerufene Gefäßreaktion. Absolute Werte (Durchschnittswerte in mm HG) vor und nach der Gefäßschädigung mit Etacrynsäure.

	Adrenalin 10^{-6} molar intravasal					
Schädigungszeit in Minuten	0	2.5	5.0	7.5	10	
Druckdiff. Ruhewert-Maximum vor der Schädigung (Wert 1)	32.17	32.22	42.88	40.87	24.86	
Standarderror (SE)	6.17	2.69	10.26	5.44	4.02	
Anzahl der Versuche (n)	11	11	5	13	5	
Druckdiff. Ruhewert-Maximum nach der Schädigung (Wert 2)	39.17	18.87	20.46	8.88	5.12	
Standarderror (SE)	7.22	3.42	4.02	3.17	3.37	
Anzahl der Versuche (n)	11	11	5	13	5	
% der Ausgangsreaktion d.h. Wert 1 = 100%, Wert 2 = x	124.21	56.46	50.3	19.47	17.87	
Standarderror (SE)	4.68	7.14	3.94	4.55	9.52	
Anzahl der Versuche (n)	11	11	5	13	5	

Tab.2 : Einfluß einer zeitlich unterschiedlich langen Einwirkung von Etacrynsäure 0.1% auf die durch extravasal applizierte Adrenalin hervorgerufene Gefäßreaktion. Absolute Werte (Durchschnittswerte in mm HG) vor und nach der Gefäßschädigung mit Etacrynsäure.

	Adrenalin 10^{-6} molar extravasal					
Schädigungszeit in Minuten	0	2.5	5.0	7.5	10	
Druckdiff. Ruhewert-Maximum vor der Schädigung (Wert 1)	36.27	37.3	41.06	44.27	38.27	
Standarderror (SE)	5.77	3.29	8.16	4.69	7.72	
Anzahl der Versuche (n)	14	14	5	14	5	
Druckdiff. Ruhewert-Maximum nach der Schädigung (Wert 2)	42.72	15.52	16.68	6.22	7.84	
Standarderror (SE)	7.93	2.52	6.16	1.89	4.83	
Anzahl der Versuche (n)	14	14	5	14	5	
% der Ausgangsreaktion d.h. Wert 1 = 100%, Wert 2= x	116.81	40.65	37.18	13.74	15.55	
Standarderror (SE)	5.05	4.24	7.88	3.95	6.31	
Anzahl der Versuche (n)	14	14	5	14	5	

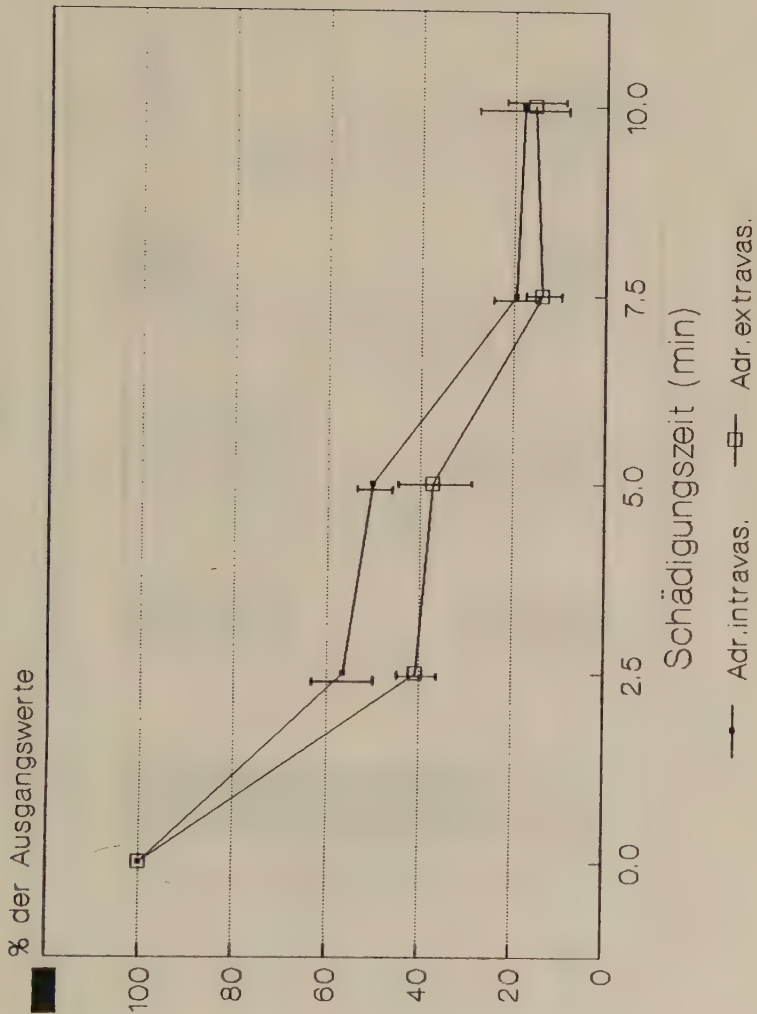


Abb.6: Zeitabhängigkeit der Schädigung mit Etacrynsäure 0.1% intravasal, ausgegeben in % der Ausgangswerte, d.h. der Wert vor der Schädigung wird als 100% gesetzt und der Wert nach der Schädigung darauf bezogen.

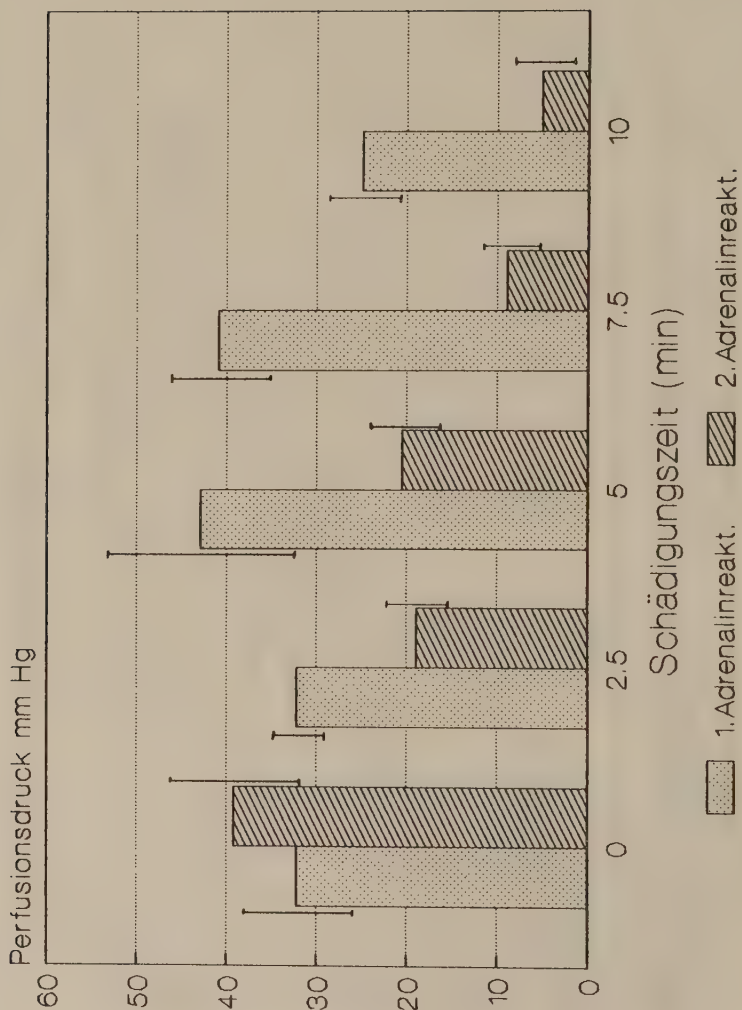


Abb.7: Zeitabhängigkeit der Schädigung mit Etacrynsäure 0.1% intravasal, ausgegeben in mm Hg Perfusionsdruck. Adrenalin wurde 10^{-6} molar intravasal gegeben.

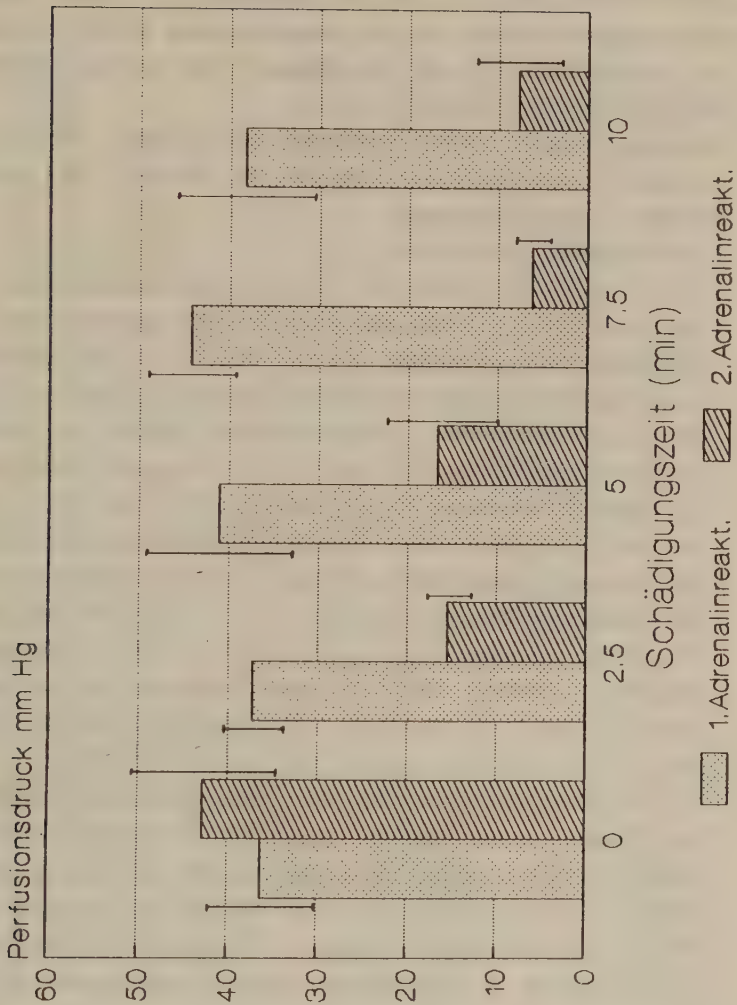


Abb.8: Zeitabhängigkeit der Schädigung mit Etacrynsäure 0.1% intravasal, ausgegeben in mm Hg Perfusionsdruck. Adrenalin wurde 10^{-6} molar extravasal gegeben.

2. Schutzwirkung von HR bei 7.5-minütiger Schädigung

Zur Applikation des HR wurde immer eine 0.05%-ige Lösung in Krebs-Ringer-Lösung verwendet, d.h. es wurde eine Ampulle "Venoruton^R" (= 500 mg Rutoside) in 1 Liter Krebs-Ringer-Lösung gelöst. Da die Konzentration des HR konstant war, konnte über die Zeit die Menge an HR variiert werden, die durch das Gefäß geflossen ist.

Folgende Versuchsvarianten wurden durchgeführt, wobei sich die Zahlen auf die Bezeichnungen in Tabelle 3 und in Abbildung 9 und 10 beziehen:

- 1. Kontrolle, siehe dazu 1.1
- 2. Die HR-Lösung wurde vor der Schädigungsphase 20 Minuten lang durch die Ohrvene perfundiert. Zwischen dem Ende dieser HR-Applikation und dem Beginn der Etacrynsäureperfusion lag eine technisch bedingte Pause von < 1 Minute. Durch diese Applikationsform sollte eine mögliche chemische Wechselwirkung zwischen HR und Etacrynsäure ausgeschlossen werden. (—————|—————)
- 3. Die HR-Lösung wurde insgesamt 20 Minuten lang durch die Ohrvenensegmente perfundiert. Nach 12.5 Minuten wurde zusätzlich Etacrynsäure 0.1 %ig 7.5 Minuten lang perfundiert. Während der 7,5 minütigen Schädigungsphase wurden die Gefäße also mit einer Mischung aus HR (Venoruton^R) und Etacrynsäure (Hydromedin^R) durchströmt. (—————|—————)
- 4. Die HR-Lösung wurde vor der Schädigungsphase 20 Minuten lang in entsprechender Konzentration in das Organbad gegeben (extravasal). Zwischen dem Ende dieser extravasalen HR-Applikation und dem Beginn der intravasalen Etacrynsäureperfusion lag eine technisch bedingte Pause von <1 Minute. Die HR-Lösung wurde durch Spülen gegen Krebs-Ringer-Lösung ausgetauscht. (—————|—————)

Tab.3 : Versuche mit einer Schädigungszeit von 7.5 min Etacrynsäure 0.1%

1)entsprechende Kontrollversuche ohne HR-Applikation

2)Gabe von HR intravasal direkt vor der Schädigung 20 Minuten lang

3)Gabe von HR intravasal 12.5 Minuten lang vor der Schädigung, dann noch 7.5 Minuten lang gemeinsam mit Etacrynsäure 0.1%

4)Gabe von HR extravasal direkt vor der Schädigung 20 Minuten lang

5)HR intra- und extravasal von Beginn des Versuchs an, d.h. ca.1 h

		Adrenalin 10 ⁻⁶ molar intravasal					
		1)Kontr. Prozent	2)20 iv Prozent	3)12.5iv Prozent	4)20 iB Prozent	5) >1 h Prozent	
% der Ausgangsreaktion		19.47	27.46	30.46	14.45	23.2	
Wert vor der Schädigung = 100%		4.55	6.56	10.77	4.41	13.66	
Standarderror (SE)		13	6	6	4	8	
Anzahl der Versuche (n)							
		Adrenalin 10 ⁻⁶ molar extravasal					
		1)Kontr. Prozent	2)20 iv Prozent	3)12.5iv Prozent	4)20 iB Prozent	5) >1 h Prozent	
% der Ausgangsreaktion		13.74	7.96	13.06	7.42	9.21	
Wert vor der Schädigung = 100%		3.95	2.58	3.82	2.98	2.33	
Standarderror (SE)		14	6	6	4	9	
Anzahl der Versuche (n)							

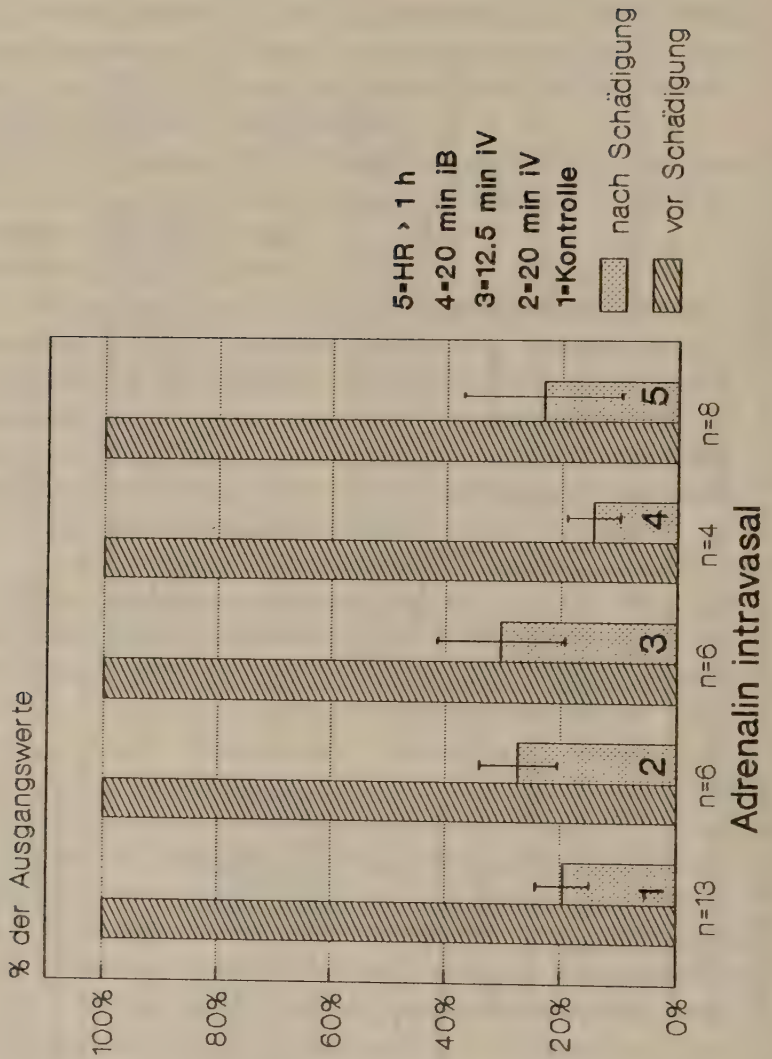


Abb.9 : Versuche mit einer Schädigungszeit von 7.5 min Etacrynsäure 0.1%
Erklärung der Legende siehe Text

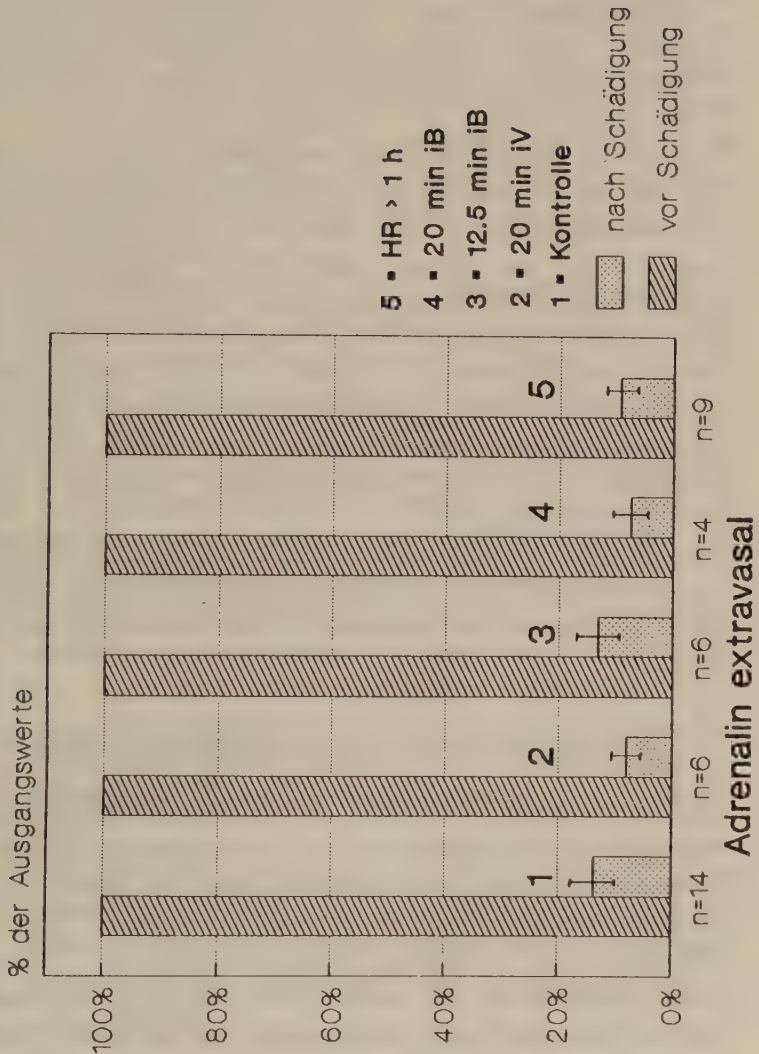


Abb.10: Versuche mit einer Schädigungszeit von 7.5 min Etacrynsäure 0.1%
Erklärung der Legende siehe Text

- 5. Die HR-Lösung wurde bei dieser Variation von Beginn des Versuchs an, d.h. ab ca. 1 Stunde vor der Schädigungsphase, sowohl intravasal perfundiert als auch in entsprechender Konzentration ins Organbad (=extravasal) gegeben. HR war also auch während der 7.5-minütigen Schädigungsphase und danach bis zum Ende des Versuchs vorhanden. (—————|—————|—————)

Wie aus der Tabelle 3 und der Abbildung 9 und 10 zu erkennen ist, konnte Etacrynsäure auch bei den mit HR behandelten Gefäßen einen in der Regel sehr starken Gefäßschaden verursachen. Bei keiner dieser vier Applikationsarten konnte ein signifikanter Gefäßschutz erreicht werden. Als eine Tendenz ergab sich bei intravasaler Adrenalin-Reaktion bei den Varianten 2, 3 und 5 eine leichte Verbesserung der Reaktivität, die jedoch statistisch nicht signifikant war (hoher Standarderror). Bei extravasaler Gabe (Organbad) von HR war die Reaktivität deutlich geringer als bei den Kontrollen.

Wie schon bei den Kontrollen war die Reaktivität bei extravasaler Gabe von Adrenalin generell geringer als bei intravasaler Gabe und durchweg unter den Werten der Kontrolle.

3. Schutzwirkung von HR bei 2.5-minütiger Schädigung

Wie die Versuche in Kapitel 1.1 zur Abhängigkeit der Schädigung mit Etacrynsäure 0.1% von der Einwirkzeit und die Versuche in Kapitel 2 zur Schutzwirkung von HR bei 7.5-minütiger Schädigung mit Etacrynsäure 0.1% zeigen, ist eine Schädigung der Gefäße bei diesen Bedingungen (7.5 min, Etacrynsäure 0.1%) als extrem stark anzusehen. Offensichtlich werden überwiegend nicht mehr regenerierbare Schäden gesetzt. Die Reaktivität fällt bei diesen Schädigungsbedingungen bei der 2. Adrenalin-Reaktion (nach der Schädi-

gung) intravasal auf 19.5 % und extravasal sogar auf 13.7 % der Ausgangswerte (= 100 % gesetzt).

Dabei ist offensichtlich ein Bereich erreicht, in dem das ganze Gefäß maximal geschädigt wird. Darauf weist auch das Ergebnis hin, daß bei weiterer Steigerung der Applikationsdauer auf 10 Minuten Etacrynsäure 0.1% keine weitere Abschwächung der Reaktivität der Gefäße auf Adrenalingabe mehr erreicht werden kann. Die nach der beschriebenen Methode sich ergebenden Prozentwerte sind unter Einbeziehung der Fehlerbreite als gleich anzusehen (intravasal 17.8 %, extravasal 15.55 %).

Auch ein Vergleich mit von anderen Untersuchern angewandten Konzentrationen und Schädigungszeiten (z.B. Bauer 7 min und 0.04 % , Nieberle 10 min und 0.01 %) zeigt, daß in den vorliegenden Versuchen insgesamt sehr hohe Konzentrationen verwendet wurden.

Diese Überlegungen führten dazu, die weiteren Versuche mit einer Schädigungszeit von 2.5 Minuten 0.1%-iger Etacrynsäure durchzuführen. Drei ausführliche Versuchsserien wurden mit genau eingehaltenem Ablauf durchgeführt:

- a) Von Beginn des Versuchs an, d.h. von ungefähr eine Stunde vor der Schädigung an wurde HR 0.05 %-ig durch die Gefäße perfundiert (intravasale Gabe) und gleichzeitig in entsprechender Konzentration im Organbad (extravasale Gabe) vorgelegt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4 und in der Abbildung 11 zusammengefaßt.
- b) Von Beginn des Versuchs an, d.h. von ungefähr eine Stunde vor der Schädigung an, wurde HR 0.05 %-ig nur intravasal durch die Gefäße perfundiert. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4 und in der Abbildung 12 zusammengefaßt.

Tab.4: Versuche mit einer Schädigungszeit von 2.5 Minuten
Etacrynsäure 0.1%. Die Gefäße wurden durch Perfusion
mit HR-Lösung geschützt.

	vor Schädigung		nach Schädigung	
Kontrolle (Krebslösung)	Adr. iV mm Hg	Adr. iB mm Hg	Adr. iV mm Hg	Adr. iB mm Hg
$\bar{x}$	32.22	37.3	18.87	15.52
SE	2.69	3.29	3.42	2.52
n	11	14	11	14
HR intra-/extravasal	Adr. iV	Adr. iB	Adr. iV	Adr. iB
$\bar{x}$	31.52	40.85	27.42	24.98
SE	2.94	4.32	3.9	4.06
n	16	17	16	17
HR nur intravasal	Adr. iV	Adr. iB	Adr. iV	Adr. iB
$\bar{x}$	27.57	33.94	21.49	20.78
SE	5.39	4.12	3.88	4.1
n	9	10	9	10
HR nur extravasal	Adr. iV	Adr. iB	Adr. iV	Adr. iB
$\bar{x}$	24.31	32.88	18.18	20.87
SE	3.23	5.28	2.92	2.86
n	12	12	13	12
Kontrolle (Krebslösung)		Adr. iV Prozent	Adr. iB Prozent	
Werte aus Spalte "nach Schaden" bezogen auf die Werte "vor Schaden" = 100 Prozent		$\bar{x}$	56.46	40.65
		Se	7.14	4.24
		n	11	14
HR intra-/extravasal		Adr. iV	Adr. iB	
		$\bar{x}$	86.84	59.84
		SE	9.87	7.06
		n	16	17
HR nur intravasal		Adr. iV	Adr. iB	
		$\bar{x}$	85.63	59.38
		SE	12.79	8.84
		n	9	10
HR nur extravasal		Adr. iV	Adr. iB	
		$\bar{x}$	86.78	71.25
		SE	8.87	6.55
		n	12	12

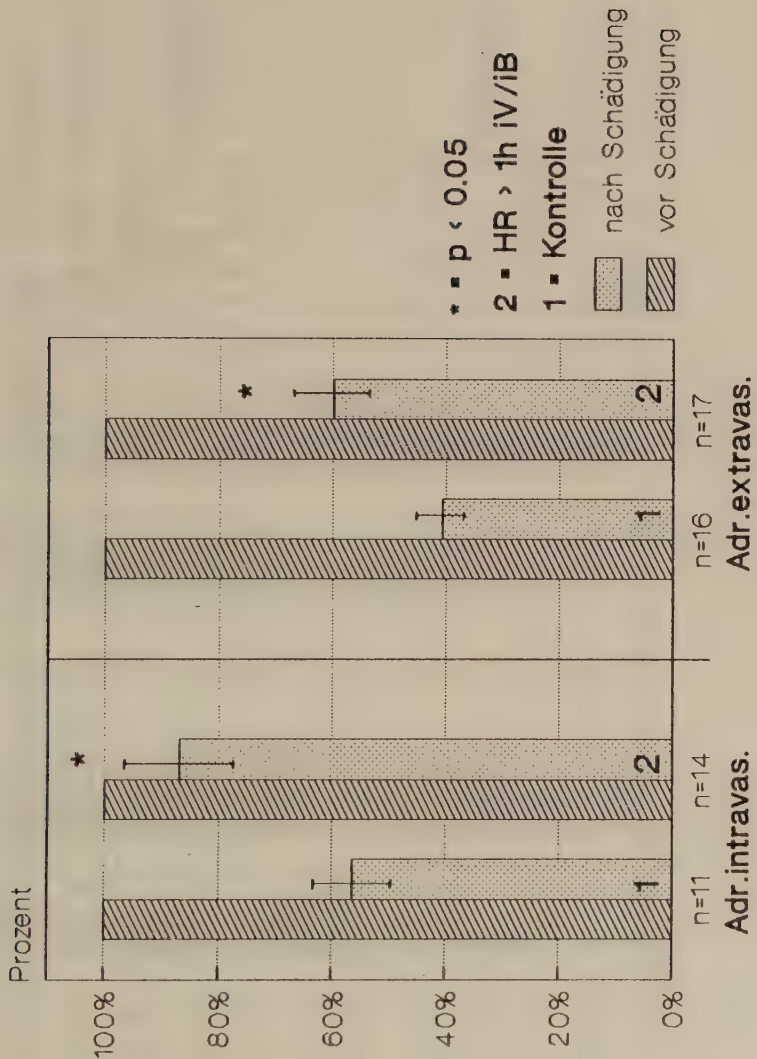


Abb.11: Versuche mit einer Schädigungszeit von 2.5 min Etacrynsäure 0.1%

1) entsprechende Kontrollversuche ohne HR-Applikation

2) HR intra/extravasal von Anfang an, d.h. ca.1 h

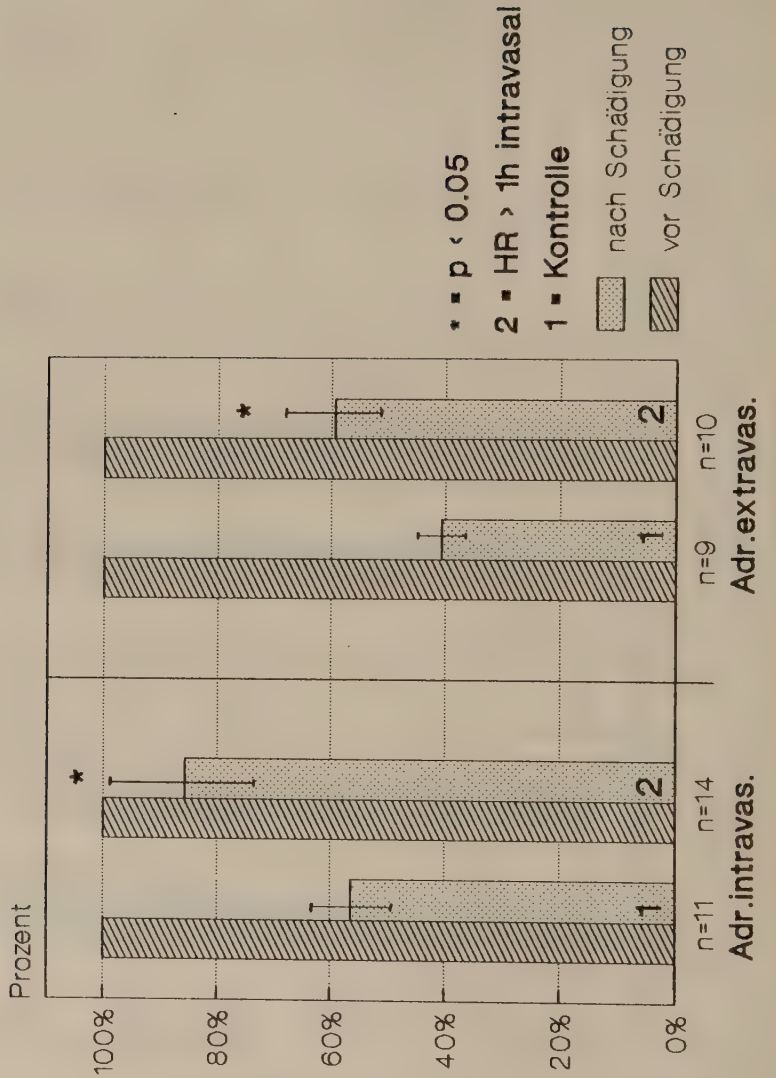


Abb.12: Versuche mit einer Schädigungszeit von
2.5 min Etacrynsäure 0.1%

- 1)entsprechende Kontrollversuche ohne HR-Applikation
- 2)HR nur intravasal von Anfang an, d.h. ca.1 h lang

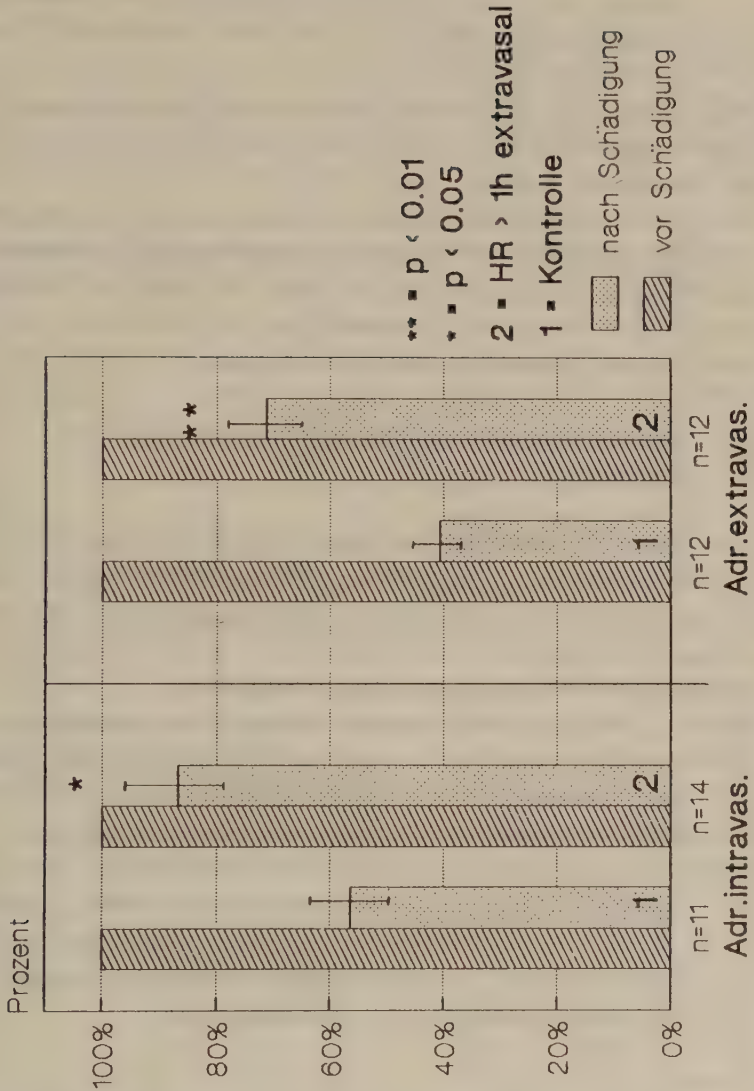


Abb.13: Versuche mit einer Schädigungszeit von 2.5 min Etacrynsäure 0.1%

- 1)entsprechende Kontrollversuche ohne HR-Applikation
- 2)HR nur extravasal von Anfang an, d.h. ca.1 h lang

- c) Von Beginn des Versuches an, d.h. von ungefähr einer Stunde vor der Schädigung an, wurde das Organbad auf einen Gehalt von 0.05 % HR eingestellt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4 und in der Abbildung 13 zusammengefaßt.

Bei allen drei Versuchsserien wurde HR auch während der Schädigungsphase und anschließend bei den Adrenalingaben im Versuch belassen.

In allen drei Serien ergab sich eine weniger starke Hemmung der Reaktivität der Gefäße gegenüber den geschädigten Kontrollen, d.h. eine Schutzwirkung, die auch statistisch signifikant war. Auf die Bewertung der einzelnen Serien wird in der Diskussion näher eingegangen.

4. Schutzwirkung von Troxerutin bei 2.5-minütiger Schädigung

Als weitere schützende Substanz wurde Troxerutin (TA-A1, Merck) eingesetzt. Es handelt sich ebenfalls um ein Substanzgemisch mit einem Anteil von Trihydroxyäthylrutosid von > 90 %. Auf die Auswirkungen dieser anderen Zusammensetzung wird in der Diskussion eingegangen.

Um eine weitestgehende Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Versuche mit Troxerutin und mit HR zu gewährleisten, wurden die Versuche mit Troxerutin unter genau gleichen Bedingungen durchgeführt wie die Versuche mit HR, d.h.:

- a) Troxerutin wurde von Beginn des Versuchs an, d.h. von ungefähr einer Stunde vor der Schädigung an, sowohl intra- als auch extravasal in einer Konzentration von 0.05% gegeben. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5 und in der Abbildung 14 zusammengefaßt.

Tab.5: Versuche mit einer Schädigungszeit von 2.5 Minuten
Etacrynsäure 0.1%. Die Gefäße wurden durch Perfusion
mit Troxerutin-Lösung geschützt.

	vor Schädigung		nach Schädigung	
Kontrolle (Krebslösung)	Adr. iV mm Hg	Adr. iB mm Hg	Adr. iV mm Hg	Adr. iB mm Hg
$\bar{x}$	32.22	37.3	18.87	15.52
SE	2.69	3.29	3.42	2.52
n	11	14	11	14
Troxerutin intra/extravas.	Adr. iV	Adr. iB	Adr. iV	Adr. iB
$\bar{x}$	28.79	33.82	22.49	21.49
SE	5.14	4.62	3.83	3.55
n	13	15	13	15
Troxerutin nur intravasal	Adr. iV	Adr. iB	Adr. iV	Adr. iB
$\bar{x}$	38.05	41.06	19.02	18.09
SE	5.83	5.58	3.3	3.66
n	15	15	15	15
Troxerutin nur extravasal	Adr. iV	Adr. iB	Adr. iV	Adr. iB
$\bar{x}$	38.27	34.00	24.06	16.86
SE	5.41	2.73	4.2	2.89
n	11	11	11	11
Kontrolle (Krebslösung)		Adr. iV Prozent	Adr. iB Prozent	
Werte aus Spalte "nach Schaden" bezogen auf die Werte "vor Schaden" = 100 Prozent		$\bar{x}$ Se n	56.46 7.14 11	
			40.65 4.24 14	
Troxerutin intra-/extravasal		Adr. iV	Adr. iB	
$\bar{x}$ SE n		87.16 9.64 13	62.01 6.24 15	
Troxerutin nur intravasal		Adr. iV	Adr. iB	
$\bar{x}$ SE n		59.61 8.44 15	47.84 6.68 15	
Troxerutin nur extravasal		Adr. iV	Adr. iB	
$\bar{x}$ SE n		63.62 5.96 11	48.25 5.14 11	

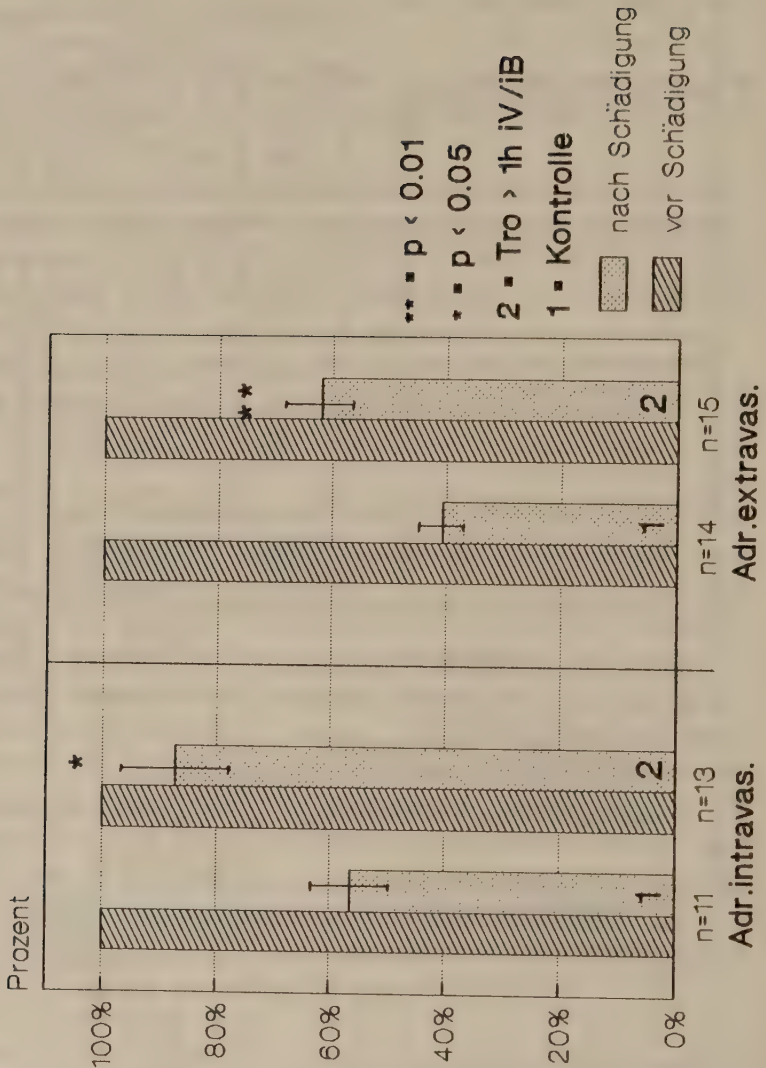


Abb.14: Versuche mit einer Schädigungszeit von 2.5 min Etacrynsäure 0.1%

1) Kontrollversuche ohne Troxerutin-Applikation

2) Troxerutin intra/extravasal von Anfang an, d.h. ca. 1

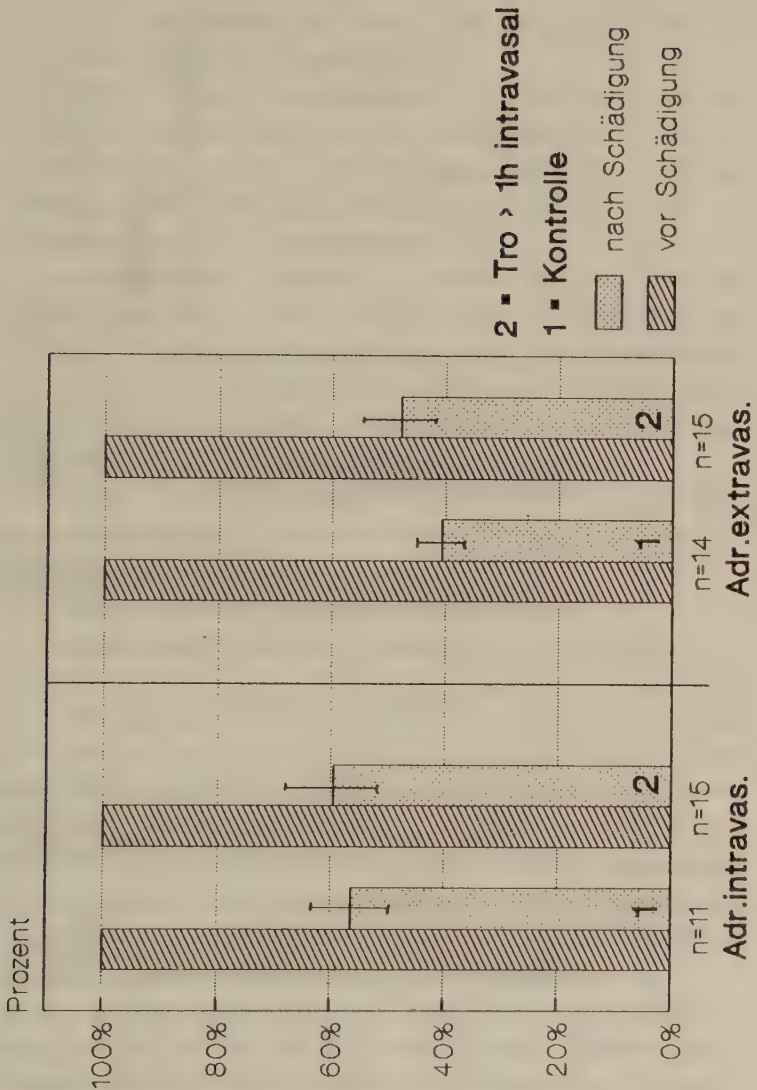


Abb.15: Versuche mit einer Schädigungszeit von 2.5 min Etacrynsäure 0.1%

- 1) Kontrollversuche ohne Troxerutin-Applikation
- 2) Troxerutin intravasal von Anfang an, d.h. ca.1 h

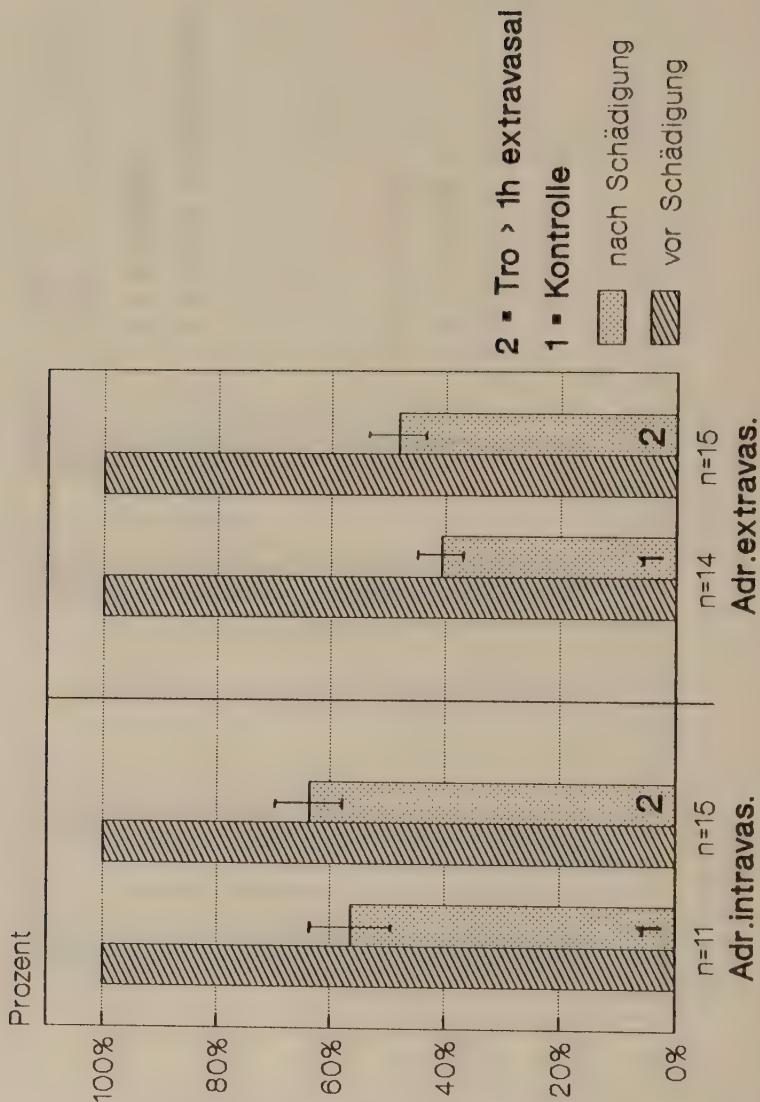


Abb.16: Versuche mit einer Schädigungszeit von 2.5 min Etacrynsäure 0.1%

1) Kontrollversuche ohne Troxerutin-Applikation

2) Troxerutin extravasal von Anfang an, d.h. ca.1 h

b) Troxerutin wurde von Beginn des Versuchs an, d.h. von ungefähr einer Stunde vor der Schädigung an, nur intravasal in einer Konzentration von 0.05% perfundiert. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5 und in der Abbildung 15 zusammengefaßt.

c) Troxerutin wurde von Beginn des Versuchs an, d.h. von ungefähr einer Stunde vor der Schädigung an, nur extravasal in einer Konzentration von 0.05% perfundiert. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5 und in der Abbildung 16 zusammengefaßt.

Die Ergebnisse sind insofern interessant, als die bei gleichzeitiger intra- und extravasaler Gabe statistisch signifikant vorhandene Schutzwirkung auf die Reaktivität der Gefäße bei den getrennten Applikationen (nur intravasal, nur extravasal) nicht bestätigt werden konnte, ja sogar bis auf eine schwache Tendenz ganz verschwandt.

Es liegt nahe, diese Effekte bei den gegebenen, gleichen Versuchsbedingungen auf die unterschiedlichen Zusammensetzungen der Substanzgemische zu beziehen.

5. Zur Wirkung von HR und Troxerutin auf die Gefäße

Um die Auswirkungen von HR und Troxerutin auf die intakten Gefäße beurteilen zu können, vor allem in Bezug auf die Versuchsserien in den Kapiteln 3 und 4, wurden zwei Versuchsserien zur Eigenwirkung der Stoffgemische gemacht. Der Aufbau und die Versuchsbedingungen wurden unverändert übernommen. Nur die Schädigungsphase wurde weggelassen (2.5 min/Etacrinsäure 0.1%). HR bzw. Troxerutin wurde jeweils intra- und extravasal gleichzeitig gegeben.

Es werden jeweils die Druckwerte nach 10^{-6} -molarer Adrenalin-gabe jeweils intra- und extravasal nach ungefähr einstündiger Perfusion mit HR bzw. Troxerutin miteinander verglichen. Diese Werte sind in der Abbildung 17 graphisch dargestellt und in der Tabelle 6 aufgelistet.

Es ergibt sich bei der intravasalen Adrenalingabe bei beiden Stoffgemischen eine Erniedrigung der Reaktivität um 4 mm Hg. Bei der extravasalen Adrenalingabe ist die Reaktivität bei HR ebenfalls um 3 mm Hg erniedrigt, während sie bei Troxerutin praktisch gleich bleibt.

Tab.6: Versuche zur Eigenwirkung von HR und Troxerutin. Die Gefäße wurden in diesem Fall nur mit Krebslösung, bzw. HR-Lösung, bzw. Troxerutinlösung perfundiert und ihre Reaktion auf Adrenalin 10^{-6} -molar gemessen.

Kontrolle (Krebslösung)		Adr. iV mm Hg	Adr. iB mm Hg
	$\bar{x}$ SE n	37.77 6.97 11	47.08 8.74 14
HR intra-/extravasal		Adr. iV	Adr. iB
	$\bar{x}$ SE n	33.64 4.69 15	44.14 4.73 19
Troxerutin intra-/extravasal		Adr. iV	Adr. iB
	$\bar{x}$ SE n	33.45 4.32 10	47.04 5.62 12

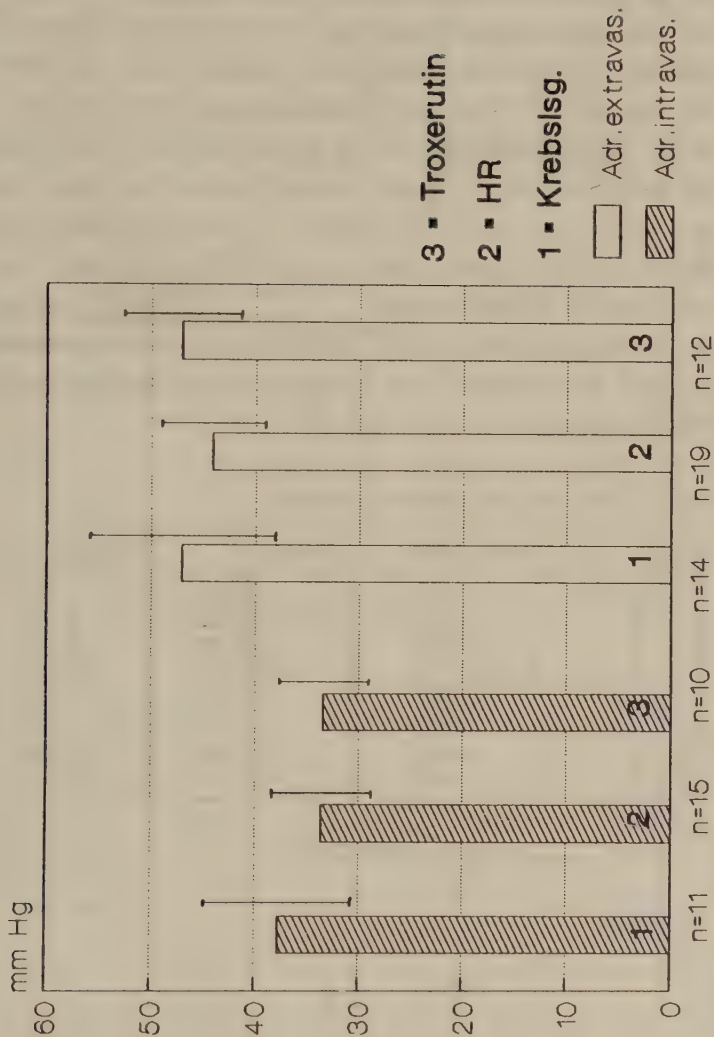


Abb.17: Versuche zur Eigenwirkung von HR und Troxerutin.

- 1) Kontrollversuche, nur mit Krebs-Lsg perfundiert
- 2) HR intra/extravasal von Anfang an, d.h. ca.1 h lang
- 3) Troxerutin intra/extravasal von Anfang an, d.h. ca.1 h

6. Zusammensetzung von HR und Troxerutin

Bei HR handelt es sich um ein Gemisch von Mono-, Di-, Tri- und Tetrahydroxyethylrutosiden. Es wird nach einem streng standardisierten Syntheseprozess hergestellt, so daß gewährleistet ist, daß die Zusammensetzung konstant ist.

Um die Zusammensetzung von HR direkt mit der von Troxerutin vergleichen zu können, wurden beide Gemische (Ampulleninhalt: 500 mg/5 ml) jeweils 1:2000 verdünnt und über HPLC wie beschrieben getrennt. Die Chromatogramme sind in Abbildung 18 wiedergegeben.

Die Chromatogramme wurden mit dem Integrator ausgewertet und über die Flächen die prozentuellen Anteile der Substanzen bestimmt.

Tab.7: HPLC von HR und Troxerutin

Peak	Ret.Zeit	Fläche	Prozent
a) 1	7.327	30.13	7.10
2	7.874	11.07	2.61
3	10.988	8.11	1.91
4	12.715	255.75	60.21
5	13.680	105.95	24.95
6	15.461	13.72	3.23
b) 1	7.276	15.83	3.39
2	12.642	450.45	96.61

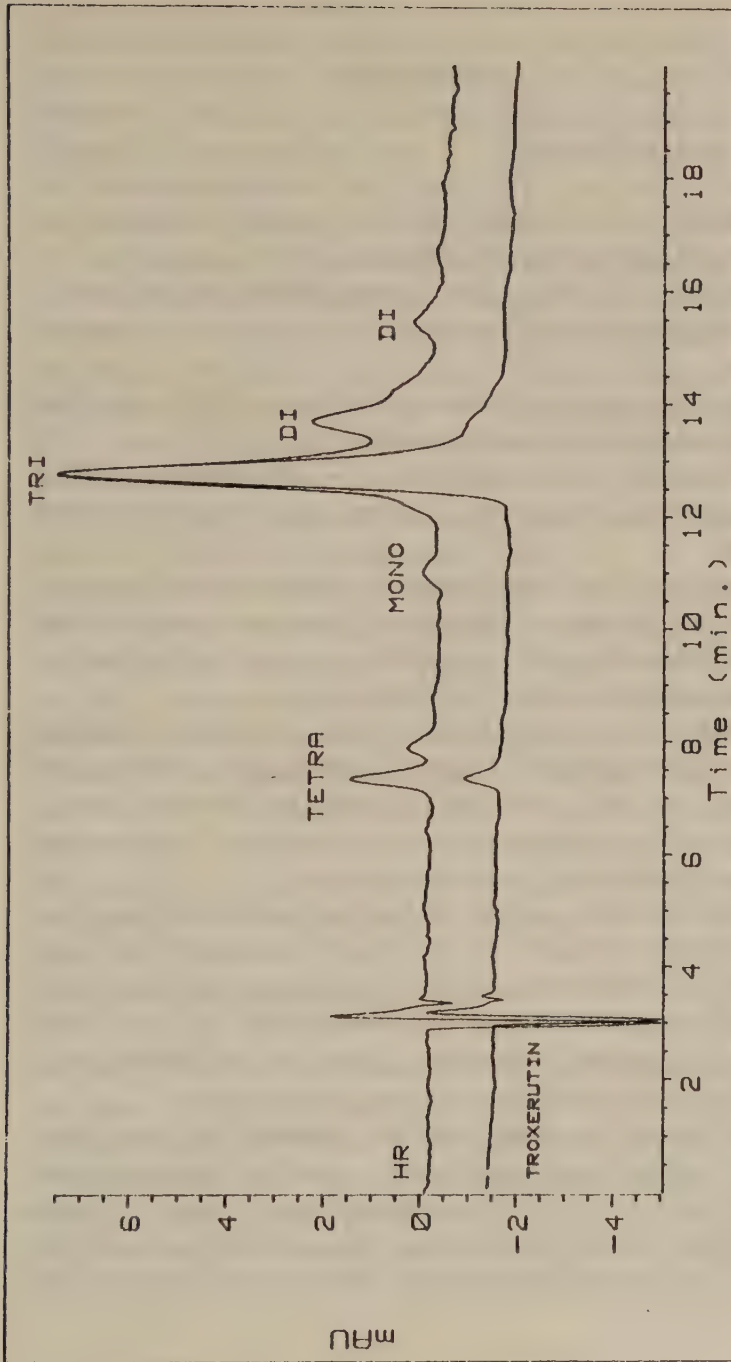


Abb.18: HPLC - Chromatogramm der Gemische HR und Troxerutin

V. DISKUSSION

1. In-vitro-Versuche

Die Vorteile der in-vitro-Versuche an der isolierten Vena auricularis lateralis des Schweines sind:

- Es steht ein nervenfreies Gefäßpräparat zur Verfügung.
- Alle applizierten Substanzen können exakt dosiert werden.
- Der intravasale und extravasale Raum ist klar voneinander getrennt und separat zugänglich.
- Vermeidung von Tierversuchen, die sehr stark in der öffentlichen Diskussion stehen und ethisch belastet sind.
- Einfache, kostenfreie Materialbeschaffung am Schlachthof, wo die Ohren praktisch als wertlose Schlachtnebenprodukte anfallen, im Gegensatz zur sehr kostenintensiven Beschaffung der Versuchstiere.
- Einfache Präparation, da die Venen im Ohr des Schweines sehr oberflächlich liegen, ausreichend groß sind und durch die helle Haut des Schweines gut sichtbar sind.
- die Art der Präparation gewährleistet eine Trennung von intravasalem und extravasalem Raum.

Bei den Versuchen an den isolierten Gefäßabschnitten fallen störende Faktoren wie Thrombozytenaggregationen, Änderungen hydrostatischer und kolloidosmotischer Drucke sowie Umverteilungsphänomene im Perfusionsstrom praktisch weg, so daß bei diesen Versuchen allein der direkt an und in der Gefäßwand verursachte Schaden erfaßt wird.

Da bei diesen Versuchen nicht die Permeabilität der Gefäßwand, sondern deren Reaktivität gegenüber Katecholaminen als Maß für den Grad der Gefäßschädigung diente, ist eine Interpretation der Versuchsergebnisse nicht ganz einfach. So war der Ausgangspunkt dieser in-vitro-Versuche der, daß

eine Schädigung der Gefäßintima die durch Katecholamine hervorgerufene Kontraktion (= Druckerhöhung) der Gefäße vermindert und diese Abnahme dem Ausmaß der Intimaschädigung direkt proportional ist.

Wie die Ergebnisse zeigen (Abb.6,7,8, Kap.V.2), war die Perfusion mit Etacrynsäure dazu geeignet, eine signifikante Abschwächung der Gefäßkontraktilität zu erzeugen. Allerdings muß davon ausgegangen werden, daß nicht nur das Endothel, sondern bei der verwendeten Konzentration und mit zunehmender Einwirkzeit auch tiefere Schichten, wie die Media, geschädigt werden. Eine Schädigung der Muskularis zeigt sich auch darin, daß nach der Gefäßschädigung die Kontraktilität der Gefäße nicht nur bei intravasaler, sondern in noch stärkerem Maße bei extravasaler Verabreichung des Adrenalins herabgesetzt wird.

Um systematische Fehler, Regenerations- und Anpassungsvorgänge, andere zeitliche Faktoren aus der Beurteilung der der Ergebnisse ausklammern zu können, wurden die Kontroll- und die Verumversuche stets nach dem gleichen zeitlichen Schema durchgeführt. Da die sich entsprechenden Kontraktilitätsprüfungen immer im gleichen zeitlichen Abstand vor und nach der Schädigung durchgeführt wurden, hat die Regeneration der Venenabschnitte keinen negativen Einfluß auf den Aussagewert der Ergebnisse hinsichtlich des Gefäßschutzes mit O-(β -Hydroxyethyl)-rutosiden.

2. Zeitabhängigkeit der Schädigung

Bei dem Diuretikum Etacrynsäure, das als gefäßschädigende Substanz eingesetzt wurde, handelt es sich um ein Phenoxyessigsäure-Derivat, das in der Niere eine starke Diurese durch Erhöhung der Elektrolytausscheidung bewirkt. Diese Substanz wurde in verschiedensten Konzentrationen angewandt. OBERMAYR (1984) hat in Versuchen zur Schädigung der

glatten Muskulatur der isolierten Pfortader der Ratte Etacrynsäure in einer Konzentration von 0.01 Prozent 15 min lang auf die Gefäße einwirken lassen. Dadurch wurde die normalerweise auftretende Verkürzung der Organpräparate nach Noradrenalingabe von 5-10% auf 0-2% reduziert.

NIEBERLE (1983) hat in Versuchen an narkotisierten Katzen zur Unspezifität der schützenden Wirkung von HR Etacrynsäure in einer Konzentration von 0.01% 10 min lang extravasal auf isolierte Gefäße und Ileumabschnitte von Meer-schweinchen einwirken lassen. "Extravasal" ist insofern irreführend, als schraubenförmige Schnitte der betreffenden Gefäße verwendet wurden, eine Unterscheidung nach intra- und extravasal also eigentlich gar nicht möglich ist. Er kommt zu dem Ergebnis, daß die schädigende Wirkung von Etacrynsäure betreffs der geschädigten Struktur unspezifisch ist.

BAUER (1987), der Etacrynsäure in einer Konzentration von 0.04% 7 min lang einwirken ließ, erwähnt, daß die Schädigung mit Etacrynsäure nur schwierig reproduzierbar ist. Auch Nieberle erwähnt dies und erkannte die Schädigung mit Etacrynsäure als irreversibel.

Ausgehend von diesen Ergebnissen sollte die Schädigung im hohen Konzentrationsbereich von Etacrynsäure abgeklärt werden. Deshalb wurde 0.1% als sehr hohe Konzentration ausgewählt. Variiert wurde die Einwirkzeit bei intravasaler Perfusion der Etacrynsäurelösung. Dies begründet durch den Gedankengang, daß der Etacrynsäure unterschiedlich lange Zeit gegeben werden soll, bis zur glatten Muskulatur (Media) einzudringen.

Durch die in Kapitel VI/1.1 beschriebenen Versuche konnten mehrere Aspekte abgeklärt werden. Es zeigte sich, daß die Schädigung mit Etacrynsäure tatsächlich relativ inkonstant war, d.h. die verschiedenen Serien haben eine große Schwankungsbreite. Dies kann jedoch bei ausreichend großer

Versuchszahl n pro Serie statistisch ausgeglichen werden. Es ergab sich eine nichtlineare Abhängigkeit der Kontraktilität der Gefäße von der unterschiedlich langen Schädigungszeit. Da die gewählte Konzentration der Etacrynsäure sehr hoch ist, tritt in den ersten 2.5 Minuten der relativ größte Schaden ein. Dieser Bereich von 0-2.5 Minuten ist aus methodischen Gründen nicht weiter aufspaltbar. Auch eine kleinere Aufteilung als in Schritte von 2.5 Minuten erschien nicht sinnvoll und hätte nur den systematischen Fehler erhöht.

An der Abbildung 6 erkennt man, daß nach 2.5 Minuten noch 56.5% der Reaktion bei intravasaler Adrenalingabe und nur noch 40.6% der Reaktion bei extravasaler Adrenalingabe vorhanden war. Interessanterweise sind die Schädigungen bei allen geprüften Zeiten bei der extravasalen Adrenalingabe größer, d.h. die %-Werte im Vergleich mit den Ausgangswerten niedriger als bei intravasaler Adrenalingabe. Daraus läßt sich schließen, daß die Etacrynsäure nicht nur auf das Endothel wirkt, sondern recht schnell auch in tiefere Gewebeschichten eindringt und dort schädigend wirkt. Dies betrifft vor allem die Media mit den glatten Muskelzellen.

Dieses Ergebnis wird ergänzt durch die Aussage von BAUER (1987), daß bei extravasaler Gabe von Etacrynsäure am "intakten" isolierten Gefäß die schädigende Wirkung von Etacrynsäure, trotz eines entgegengesetzten Druckgefälles, besonders groß war und sehr starke Schwankungen im Ausmaß der Schädigung der glatten Muskelzellen vorlagen. Die Schranke des Endothels fällt in diesem Fall ja weg.

Dieser Unterschied der Schädigung bei intra- und extravasaler Gabe von Adrenalin wird mit zunehmender Einwirkdauer kleiner, d.h. er schrumpft von 16% bei 2.5 Minuten Etacrynsäure auf 2% bei 10 Minuten Etacrynsäureeinwirkung. Auch dies ergänzt die Aussagen gut. Die nicht so schädi-

gungsgefährdete intravasale Reaktion wird bei ausreichend langer Einwirkzeit relativ stärker geschädigt und erreicht dann fast das Ausmaß der extravasalen Reaktion. Auch ist offensichtlich bei 7.5 Minuten Einwirkzeit und mehr ein gewisses Maximum der Schädigung erreicht, da die Werte sich bei 10-15% der Ausgangswerte einpendeln. Bei 10 Minuten Einwirkdauer waren auch schon mehr als 50 % der Gefäße so stark geschädigt, daß sie keinerlei Reaktion mehr zeigten.

HAMMERSEN (1983) untersuchte elektronenmikroskopisch die terminale Strombahn der Skelettmuskulatur der Katze nach Schädigung mit Etacrynsäure oder Polidocanol. Er fand:

- 1. Zahlreiche Gefäßverschlüsse durch Thrombozytenaggregate, z.T. mit örtlich begrenzten Auflösungen des endothelialen Zellverbandes.
- 2. Eine starke Abflachung des Endothels mit Ausbildung tiefer Invaginationen der luminalen Zellmembran. Neben einer Verminderung der Diffusionsstrecke wird dadurch auch die Endotheloberfläche vergrößert sowie die Bildung transendothelialer Kanäle als Folge von Vesikelfusionen erleichtert.
- 3. Ein Auftreten zahlreicher lumenwärts gerichteter, blasiger Endothelprotuberanzen. Diese Veränderungen in der Gefäßbahn stellen das strukturelle Korrelat für die erhöhte Permeabilität großmolekularer Stoffe dar.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Schädigung mit Etacrynsäure auch über die Einwirkzeit beeinflußt werden kann, daß sie besonders stark die glatten Muskelzellen schädigt und daß auch eine totale Zerstörung aller erregbaren Strukturen möglich ist. Dies könnte dahingehend erklärt werden, daß durch die Etacrynsäure die Durchlässigkeit des Endothels stark erhöht wird (Abflachung, Invagination, usw.), daß dadurch die Etacrynsäure rasch tiefer

eindringen kann und dann die Membranstrukturen der glatten Muskelzellen schädigt. Erst bei längerer Einwirkung werden auch die endothelialen Strukturen dann vergleichbar stark geschädigt.

3. Wirkung von HR und Troxerutin

Um ausschließen zu können, daß HR oder Troxerutin selbst Kreislauf bzw. Gefäß aktivierende Eigenschaften haben, wurden Versuche zur Eigenwirkung dieser Stoffgemische unternommen. Es zeigten sich dabei keinerlei direkte, vasoaktive Reaktionen im Sinne einer spontanen Druckerhöhung oder -verminderung.

Es ergaben sich jedoch interessante Hinweise auf eine leichte Hemmung der Wirkung biogener Amine und Kinine. Hinweise darauf finden sich in zahlreichen Arbeiten (FELIX 1970; LECOMTE und VAN CAUWENBERGER 1974; GABOR 1972 und 1978; VAN CAUWENBERGER und FRANCHI-MONT 1967). Bei der Durchführung der Versuche nach dem üblichen Schema, nur ohne Schädigungsphase, ergab sich, daß die 2. Adrenalin-Reaktion (also nach ungefähr 1.5-2 Stunden HR- bzw. Troxerutinperfusion) bei den HR- bzw. Troxerutinperfundierten Gefäßen um 4 mm Hg vermindert war im Vergleich mit der 2. Reaktion bei nur mit Krebslösung perfundierten Gefäßen. Um eine Vergleichbarkeit herzustellen, wurden für diese Auswertung nur Gefäße ausgewählt, die bei der 1. Adrenalin-Reaktion gleiche Drucksteigerungen gezeigt hatten. Obwohl die Effekte gering und statistisch nicht zu verifizieren sind, erscheint die Tendenz homogen mit den oben erwähnten Hinweisen in der Literatur. Die gefäßschützenden Stoffe scheinen über ihre nachgewiesenen membranstabilisierenden Effekt indirekt die Wirksamkeit von Aminen und Kininen etwas zu dämpfen. Dies entspricht ihren chemischen Eigenschaften, die sehr wohl eine Einlagerung in biologische

sche Membranen erlauben. Dies würde der nachgewiesenen Fixierung im Gewebe (FELIX 1983) entsprechen, was ja die geringe Auswaschbarkeit von HR bei chronisch oraler Applikation erklärt.

Der oben beschriebene Effekt wurde bei der extravasalen Adrenalinreaktion von mit Troxerutin behandelten Gefäßen nicht gefunden. Dies könnte damit erklärt werden, daß Troxerutin nicht so gute Eindringeeigenschaften hat und extravasal die entsprechenden Strukturen nicht erreicht hat.

4. Gefäßschützende Wirkung von HR

4.1 Versuche mit 7,5-minütiger Einwirkdauer

Es wurde eine sehr hohe Konzentration an Etacrynsäure für die Schädigung gewählt, was natürlich für die 7,5-minütige Schädigung in besonderem Maße gilt. Bei der intravasalen Adrenalinreaktion zeigten die Gefäße noch um 20 Prozent Restreaktion, bei der extravasalen Adrenalinreaktion zwischen 10 und 15 Prozent Restreaktion. Statistisch waren die Unterschiede zwischen den ungeschädigten Kontrollen und den Verumversuchen nicht signifikant. Trotzdem sind die sich ergebenden Tendenzen interessant, da sie durch die signifikanten Ergebnisse der Versuche mit 2,5-minütiger Schädigung bestätigt werden.

HR zeigt eine Schutzwirkung auf die intravasale Adrenalinreaktion der geschädigten Gefäße, wenn es:

- 20 Minuten direkt vor der Etacrynsäure,
- 12,5 Minuten vor der Etacrynsäure und dann 7,5 Minuten zusammen mit Etacrynsäure,
- intra- und extravasal gleichzeitig ca. 1 Stunde vor der Etacrynsäure gegeben wird.

Auffällig ist die nicht vorhandene Schutzwirkung bei 20-minütiger extravasaler Gabe von HR. Die intravasale Adrenalinreaktion wird, naheliegender Weise, bei extravasaler, kurzzeitiger Gabe von HR nicht geschützt.

Die extravasalen Adrenalinreaktionen werden bei allen Applikationsarten von HR nicht geschützt. Offensichtlich sind die Einwirkzeiten für das HR zu kurz, um ein Eindringen in tiefere Gewebeschichten und eine Fixierung dort zu ermöglichen, so daß die glatten Muskelzellen gegen die große Schädigung bei 7.5-minütiger Etacrynsäureeinwirkung nicht geschützt sind.

Es ergibt sich insgesamt ein homogenes Bild. Da die Einwirkzeit von HR recht kurz ist und der verursachte Schaden groß, sind die Effekte relativ gering. Vorrangig geschützt zu sein scheinen die intravasalen, oberflächlichen, d.h. endothelialen Strukturen. Sie zeigen gegenüber den Kontrollen verbesserte Werte. Eine Diffusion oder ein Transport von HR bis in tiefere Schichten scheint in der Kürze der Zeit nicht in ausreichendem Maße stattzufinden. Daß eine Fixierung von HR im Gewebe stattfindet, konnte schon NIEBERLE (1983) zeigen. So sind die extravasalen Strukturen praktisch ungeschützt, wie ja auch die extravasalen Adrenalinreaktionen zeigen.

4.2 Versuche mit 2.5-minütiger Einwirkdauer

Anknüpfend an die Ergebnisse der Versuche mit 7.5-minütiger Schädigung wurde nun die Einwirkzeit des Schädigungsmittels Etacrynsäure verringert. Grundlage war der Gedanke, daß bei einem geringeren Schaden eine größere Schutzwirkung nachweisbar ist.

Diese konnte auch bei allen drei Applikationsarten für das HR bestätigt werden und ein statistisch signifikanter Schutz der intravasalen sowie der extravasalen Adrenalinreaktion nachgewiesen werden (Abb.11,12,13). Wieder ist

die extravasale Reaktion stärker geschädigt als die intravasale. Auch der von HR vermittelte Schutz verhält sich entsprechend.

Offensichtlich wird durch die sehr lange Einwirkzeit dem HR ausreichend Zeit gegeben, ins Gewebe einzudringen, sich zu verteilen und fixiert zu werden. Es ergeben sich vernachlässigbar kleine Unterschiede zwischen den verschiedenen Applikationsarten von HR, nämlich intra- und extravasal gemeinsam, nur intravasal und nur extravasal.

Mit einer Ausnahme: bei extravasaler HR-Gabe ergibt sich bei ebenfalls extravasaler Adrenalingabe eine noch höhere Schutzwirkung (hochsignifikant). Auch dies durchaus passend zu der obigen Theorie, daß zwischen einer intravasalen und einer extravasalen (tiefere Gewebeschichten betreffenden) Schutzwirkung unterschieden werden muß. Bei ausreichend langem Vorhandensein von HR "von außen" kann es eben tief genug ins Gewebe diffundieren (kein Transport) und die glatten Muskelzellen besser schützen.

5. Gefäßschützende Wirkung von Troxerutin

Die in enger Anlehnung an die Versuche mit HR durchgeführten Versuche mit Troxerutin brachten das überraschende Ergebnis, daß Troxerutin zwar bei sehr langer Einwirkung ebenfalls eine signifikante Schutzwirkung vermittelt. Diese ist jedoch bei nur intravasaler oder nur extravasaler Applikation nicht mehr vorhanden, bis auf eine geringe Tendenz. Offensichtlich reichen die Eindringeeigenschaften von Troxerutin mit seinem höheren Anteil an Tri- und Tetrahydroxyethylrutosiden nicht mehr aus, um bei bei intravasaler oder nur extravasaler Applikation von Troxerutin einen signifikanten Schutz zu vermitteln. Die Unterschiede zwischen intra- und extravasaler Adrenalinreaktion sind mit den Reaktionen beim Schutz mit HR durchaus vergleichbar.

6. Wirkungsmechanismus der O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside

Zusammenfassend kann man sagen, daß sich durch HR und Troxerutin ein signifikanter Gefäßschutz vermitteln läßt. Die bei diesen Versuchen verwendete O-(β -Hydroxyethyl)rutosid-Konzentration (50 mg/100 ml Krebslösung) liegt mit 6.6×10^{-4} mol/l nahe bei der früher schon ermittelten "optimalen Konzentration" von 7×10^{-4} mol/l für in-vitro-Versuche (FELIX et al. 1983). Bei den damals durchgeführten Versuchen war sowohl bei der Katze als auch bei in-vitro-Versuchen an der Pfortader und der Aorta von Ratten ein signifikanter Gefäßschutz vorhanden. Allerdings wurden bei diesen Versuchen die isolierten Gefäße in schraubenförmige Streifen geschnitten. Die Gefäßwand wurde im Organbad also von allen Seiten mit der O-(β -Hydroxyethyl)-rutosid-Lösung umspült, während bei den eigenen in-vitro-Versuchen die Ohrvenenabschnitte "intakt" mit der O-(β -Hydroxyethyl)-rutosid-Lösung perfundiert wurden, der intra- und extravasale Raum somit getrennt waren.

Daß die Schutzwirkung bei 7.5-minütiger Schädigung und nur 20 Minuten HR-Gabe nur schwach und nicht signifikant war, ist ein weiterer Hinweis, daß die O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside über einen aktiven Transportmechanismus durch das Endothel geschleust werden. Dieser wäre ja von der Zeit abhängig. Daß die Schädigungszeit jedoch relativ lang ist, haben die Unterschiede zwischen 7.5 Minuten und 2.5 Minuten Etacrynsäure sehr anschaulich gezeigt, d.h. HR kann den maximalen Schaden bei 7.5 min nicht mehr verhindern. Da bei der chronischen Veneninsuffizienz des Menschen im Vergleich zu den Tierversuchen und zu Organmodellen wesentlich weniger aggressive, jedoch meist chronische Vorgänge für die Gefäßschädigung verantwortlich sind (FELIX 1983), scheint der Schutz bei derartigen Veränderungen mit HR umso aussichtsreicher.

Im Laufe der letzten Jahre wurden von vielen verschiedenen Autoren Hinweise zur gefäßschützenden Wirkungsweise der O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside beigetragen. Sie wurden schon im Abschnitt "Literatur" zusammengefaßt. Sie zeigen, daß das ödemprotektive Wirkungsprinzip sehr wahrscheinlich aus einem Zusammenspiel vieler unterschiedlicher Faktoren resultiert. Man spricht auch von einem unspezifischen Wirkungsprinzip, wobei sich die Unspezifität sowohl auf das zu schützende Gewebe als auch auf die verursachende Noxe bezieht.

Die im Rahmen der eigenen Untersuchungen erzielten Ergebnisse sprechen dafür, daß aktive und passive Transport- und Verteilungsprozesse eine nicht unwesentliche Rolle bei der gefäßschützenden Wirkung der O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside spielen. Es erscheint völlig unwahrscheinlich, daß die permeabilitätsvermindernde Wirkung von O-(β -Hydroxyethyl)rutosiden allein darauf beruht, daß diese Substanzen die Gefäßinnenfläche in Form eines Schutzfilms auskleiden und somit mehr oder weniger rein mechanisch den Durchtritt von Molekülen durch die Gefäßwand vermindert.

Zusätzlich zu den Transport- und Verteilungsprozessen spielen wahrscheinlich noch folgende Faktoren eine Rolle bei der ödemprotektiven Wirkung der O-(β -Hydroxyethyl)rutoside:

- Hemmung der Wirkung biogener Amine und Kinine. Mit der Hemmung dieser gefäßaktiven Substanzen wirken O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside sowohl einer Erhöhung der Durchströmung kleinster Gefäße als auch einer Steigerung der Gefäßpermeabilität entgegen (FELIX 1970; LECOMTE und VAN CAUWENBERGER 1974; GABOR 1972 und 1978; CAU-WENBERGER und FRANCHIMONT 1967).

- Verbesserung der Fließeigenschaften des Blutes, wobei hierfür vor allem eine Hemmung der Aggregation von Thrombozyten und Erythrozyten, sowie eine Verbesserung der Verformbarkeit der Erythrozyten verantwortlich sind (SCHMID-SCHÖNBEIN 1975; KIESEWETTER 1983; BÄCHMANN 1983).
- Dichtungseffekte an der terminalen Strombahn. Hierbei kommen als Angriffspunkt sowohl die Endothelporen (FELIX 1970 und 1972), die Interzellularräume (HLADOVEC 1977; CASLEY-SMITH 1976), als auch die Basalmembran oder das interstitielle Bindegewebe in Frage.
- Allgemeiner protektiver Membraneffekt (HAMMERSEN 1978 und 1983; FELIX 1983). Dieser membranschützende Effekt der O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside kann sich auf vielerlei Weise ödemprotektiv auswirken. Einerseits kann die Ausschüttung lysosomaler Enzyme vermindert werden, andererseits können dadurch membrangebundene Enzymsysteme geschützt werden, und schließlich kann sich dieser schützende Membraneffekt auch auf die Endothelzellen auswirken.

Berücksichtigt man zu den eigenen Ergebnissen auch diese vielen Aspekte, so sind die therapeutischen HR-Verabreichungen durchaus als wirksame zusätzliche Maßnahme bei an Varizen oder an chronisch-venöser Insuffizienz leidenden Patienten zu sehen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY

Die gefäßschützende Wirkung von HR und von Troxerutin wurde bei in vitro Versuchen an isolierten Ohrrendvenen des Schweines untersucht. Hierzu wurden die Gefäßsegmente in einem Organbad fixiert und strömungskonstant perfundiert. Als Maß für die protective Wirksamkeit der untersuchten Substanzen wurde die Reaktivität, d.h. das Maß der Druckerhöhung nach der Gabe von Adrenalin, verwendet. Die Gefäße wurden durch Perfusion mit einer 0.1 %igen Etacrynsäurelösung geschädigt.

Das Modell der isolierten Vena auricularis des Schweines erwies sich als besonders geeignet für derartige Versuche. Die Präparation ist einfach und Störfaktoren lassen sich leicht abgrenzen.

Die Schädigung mit 0.1 %iger Etacrynsäurelösung zeigte bei konstanter Konzentration eine klare Abhängigkeit von der Einwirkzeit, so daß man bei gleicher Einwirkdauer von einer stets gleich starken Beeinflussung ausgehen konnte.

Die gefäßschützende Wirkung von HR und, teilweise, auch von Troxerutin konnte bei den Versuchen mit den isolierten Ohrrendvenen eindrucksvoll nachgewiesen werden. Selbst bei der sehr hohen Einwirkzeit der Schädigungssubstanz Etacrynsäure von 7.5 Minuten zeigte HR noch eine schützende Wirkung, die jedoch nicht statistisch signifikant war.

Bei einer Etacrynsäureeinwirkzeit von 2.5 Minuten war der Schutz dann statistisch signifikant. Die Unterschiede zwischen HR und Troxerutin zeigen, daß eine Änderung in der Zusammensetzung der Stoffgemische deutliche Auswirkungen auf die Eindringfähigkeiten und die Verteilung der Stoffe haben und damit auch indirekt auf die Schutzwirkung.

Title: Comparably investigation on the protective effect of O-(β -Hydroxyethyl)-rutosides and Troxerutin at the venae auriculares of swines.

The protective effect on vessels of the substances HR and Troxerutin was investigated in experiments in vitro with isolated venae auriculares of swines.

For that purpose, the vessel segments were fixed in an organbath and perfused with constant velocity of flow. As a parameter for the protective effect of the tested substances was used the reaction of the vessels, that is, they contracted after the application of adrenalin and the pressure increased.

The vessels were injured by perfusing with a solution of 0,1 % Etacryn acid.

Working with isolated venae auriculares was found perfectly suitable for experiments of this kind. The preparation was easy and interference factors could be delimited without effort.

The injury by a solution of 0,1 % Etacryn acid showed an evident dependance on the time of perfusion. Always the same influence could be supposed, provided that the period of injury was constant.

The protective effect of HR and, to some extent, also of Troxerutin could be demonstrated impressively by the experiments with isolated venae auriculares.

Even using the very long perfusion time of 7.5 minutes, HR showed an protective effect, but not in a significant dimension. Reducing the perfusion time to 2.5 minutes, a significant protection could be found.

The differences between HR and Troxerutin demonstrated, that a varied composition of ingredients has an evident effect on the penetration and distribution of the substances and also on their protective effectiveness.

LITERATURVERZEICHNIS

AMBROSE A.M., DeEDS F. (1949): Further Observations on the Effect of Rutin and Related Compounds on Cutaneous Capillaries
J. Pharmacol. exp. Ther. 97, 115-119

BÄCHMANN A. (1983): Der Einfluß von Venoruton auf die Blutviskosität und venöse Rückstromgeschwindigkeit
in: Voelter W., Jung G. (Hrsg.): O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside
Neue Ergebnisse in Experiment und Klinik, 159-162
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio

BALANT L.P., (1983):
Klinische Pharmakologie der O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside
in: Voelter W., Jung G. (Hrsg.): O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside
Neue Ergebnisse in Experiment und Klinik, 31-45
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio

BARGMANN W., (1977):
Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen
Georg Thieme Verlag, Stuttgart

BARROW A., GRIFFITHS L.A. (1974):
Metabolism of the Hydroxyethylrutosides
III. The Fate of Orally Administered Hydroxyethylrutosides
in Laboratory Animals
Xenobiotica 4, 743-754,

BAUER G. (1987): Diss. ved. med. LMU München
Mündliche Mitteilungen

BIESENDORFER H., FELIX W., WILDENAUER D. (1981):
Studies on the Haemolytic Action of Amphiphilic Substances
in vitro
Biochemical Pharm. Vol. 30, No 16, 2287-2292

BÖHM K., (1959, 1960):
Die Bedeutung der Veneninsuffizienz in der Praxis
Arzneim. Forsch. 9, 539, 647, 778 (1959)
Arzneim. Forsch. 10, 54, 139, 188, 468 (1960)

CASLEY-SMITH J.R. (1976): The Actions of Benzo-pyrones
on the Blood-Tissue-Lymph-System
Folia Angiologica, 24, 7-22

CLAUSS G., EBNER H., (1975): Grundlagen der Statistik
Verlag Harri Deutsch, Zürich

CLOUGH G., (1983): Der Einfluß verschiedener physiologischer Parameter auf den vesikulären Transport
in: Meßmer K., Hammersen F.,
Struktur und Funktion endothelialer Zellen
S.Karger, Basel, München, Paris, London, New York, Tokio

COURBAT P., FAVRE J., GUERNE P., UHLMANN G., (1966):
Helv. Chim. Acta 49, 1205

DE LA LANDE I. S., RAND M. J., (1965):
A simple isolate nerve-blood vessel preparation
Aus. J. exp. Biol. Sci. 43, 639-659

DE MEY J., VANHOUTTE P.M., (1980): Effekt of removal
and substitution of potassium ions on the adrenergic and
cholinergic reactivity in canine femoral artery
Eur. J. Pharm. 67, 159-164

FELIX W. (1970):
Wirkungsmechanismus der internen Therapie mit "Venopharmaca"
Dt. med. Journ. 21, 456-465

FELIX W., REMIEN J., HÄLLFRITSCH K. (1971):
Zur Messung von Venenreaktionen im Tierversuch
Pflügers Arch. 329, 352-359

FELIX W. (1972): Zum Mechanismus der antiödematösen
Wirkung von O-(β -Hydroxyethyl)-rutosiden
Dt. med. Journ. 23, 403.405

FELIX W., (1980):
Zum Problem "Venenmittel"
Med. Welt 31, 813-816

FELIX W., (1981): Pharmakologie S.63-97
in: Ruolfski G. (Hrsg): Zirkulation - Angewandte Angiologie
Perimed Fachbuch Verlagsgesellschaft mbH, Erlangen

FELIX W., (1982): Pharmakologie
in: Rieger H. (Hrsg): Untersuchungen zur Epidemiologie,
Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie venöser Erkrankungen
Vasa Supplementum 7, Huber-Verlag Bern

FELIX W., NIEBERLE J., SCHMIDT G. (1983):
Wirksamkeit von O-(β -Hydroxyethyl)-rutosiden bei peroraler
Applikation und Unspezifität ihrer protektiven Wirkung
in: Voelter W., Jung G. (Hrsg.): O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside
Neue Ergebnisse in Experiment und Klinik, 65-74
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio

FELIX W., (1986): Spektrum Venenmittel
Arzneitherapie heute, Bd. 45
Aesopus Verlag, Zug

FIELD J.B., RECKERS R.E., (1949): Amer. J. med. Sci. 218, 1

FISCHER H. (1981): Venenleiden, Tübinger Studie
Urban u. Schwarzenberg, München-Berlin-Wien

FISCHER H. (1983): Sozioepidemiologische Studie über die Venenleiden bei einer erwachsenen Wohnbevölkerung in der BRD
in: Voelter W., Jung G. (Hrsg.): O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside
Neue Ergebnisse in Experiment und Klinik
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio

FÖRSTER H. (1978):
Resorption und Stoffwechsel von Hydroxyethylrutosiden
in: Voelter W., Jung G. (Hrsg.): O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside
Experimentelle und klinische Ergebnisse
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio

FRITZ-NIGGLI H. (1978):
Rutoside und strahleninduzierte Tumorregression
in: Voelter W., Jung G. (Hrsg.): O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside
Experimentelle und klinische Ergebnisse, 169-180
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio

FRITZ-NIGGLI H. (1983): Experimentelle Daten zur Wirkung
von HR in der Radioprotektion
in: Voelter W., Jung G. (Hrsg.): O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside
Neue Ergebnisse in Experiment und Klinik, 225-235
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio

FROKJAER-JENSEN J., (1983):
Das System der Membranvesikel des Kapillarendothels
in: Meßmer K., Hammersen F.
Struktur und Funktion endothelialer Zellen
S.Karger, Basel, München, Paris, London, New York, Tokio

GABBIANI G., MAJNO G. (1977):
Fine Structure of Endothelium, S.133-144
in: Kaley g., Altura B. (Hrsg.): Microcirculation, Volume I
University Park Press, Baltimore, London, Tokio

GABOR M., (1972):
Pharmacologic Effects of Flavonoids on Blood Vessels
Angiologica 2,355-374

GABOR M., BLAZSO G. (1978):
Effekt von Rutosiden auf das Rattenpfoten-Ödem
in: Voelter W., Jung G. (Hrsg.): O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside
Experimentelle und klinische Ergebnisse
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio

GAUER O.H., KRAMER K., JUNG (Hrsg.):
Kreislauf des Blutes
in: Physiologie des Menschen Bd. 3, 81-268
Urban & Schwarzenberg, München, Berlin, Wien

GLOOR M., ROTHER H., FRIEDRICH H.C. (1974):
Zit. nach: Gabor M., GaborB.
Effekt von Rutosiden auf das Rattenpfoten-Ödem
Z. Hautkr. 49, 393

GOLDEN G. (1978): Eine Übersicht über neue pharmakologische Effekte und klinische Resultate von O-(β -Hydroxyethyl)-rutosiden in: Voelter W., Jung G. (Hrsg.): O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside Experimentelle und klinische Ergebnisse, 141-153 Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio

GRIMM G., (1987):

Einfluss von O-(β -Hydroxyethyl)-Rutosiden auf Permeabilität und Reaktivität von Blutgefäßen in vivo und in vitro
Dissertation LMU München

GUGLER R., DENGLER H.R. (1973): Inhibition of Human Liver Catechol-O-Methyltransferase by Flavonoids
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 276, 223-233

HACKETT A.M., GRIFFITHS L.A. (1977a):
Enterohepatic cycling of O-(β -Hydroxyethyl)-rutosides and their biliary metabolites in the rat
Experientia 33, 161-163

HACKETT A.M., GRIFFITHS L.A. (1977b):
The Disposition and Metabolism of 3'4'7-Tri-O-HR and 7-MonoHR in the Mouse
Xenobiotica 7, 641-651

HACKETT A.M., GRIFFITHS L.A., LUYCKX A.S., (1976):
Metabolism of Hydroxyethylrutosides
Arzneim.-Forsch. 26, 925-928

HAMMERSEN F. (1970):
Zur Ultrastruktur experimenteller Ödeme
Biorheology 6, 343

HAMMERSEN F. (1978): Zur Ultrastruktur experimenteller Ödeme und deren Beeinflussung durch O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside in: Voelter W., Jung G. (Hrsg.): O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside Experimentelle und klinische Ergebnisse, 103-120 Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio

HAMMERSEN F., HAMMERSEN E. (1983): Zur Ultrastruktur des durch Etacrynsäure oder Polidocanol hervorgerufenen Ödems und seine Beeinflussung durch O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside in: Voelter W., Jung G. (Hrsg.): O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside Neue Ergebnisse in Experiment und Klinik, 75-92 Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio

HAMMERSEN F., FISCHER H., BRÄUER H. (1985):
Blutfluß, Venen und Ödeme
Müller & Steinicke, München

HARMS J., KARCHER K.-H., KLEINERT H. (1964):
Über die Behandlung der Strahlenreaktion der Schleimhaut
Med. Welt 15, 1125-1129

HAUCK G., SCHRÖER H. (1969):
Vitalmikroskopische Untersuchungen zur Lokalisation der Eiweißpermeabilität an der Endstrombahn von Warmblütern
Pflügers Arch. 312, 32-44

HLADOVEC J. (1977): Vasotropic Drugs
Arzneim.-Forsch. 27, 1073-1076

- JUNG G., OTTNAND M., VOELTER W. (1977):
Quantitative Determination of O-(β -Hydroxyethyl)-rutosides
in human blood after intravenous and oral administration
by circular dichroism
Europ. J. of Drug Metab. and Pharm. 1, 131-141
- KIESEWETTER H., RADKE H., JUNG F., SCHNEIDER R. (1983):
Rheologische Wirksamkeit von Venoruton
in: Voelter W., Jung G. (Hrsg.): O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside
Neue Ergebnisse in Experiment und Klinik, 47-53
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio
- KLEMM J. (1970): Besitzt O-(β -Hydroxyethyl)-rutosid einen
protektiven Effekt im bestrahlten und unbestrahlten Gewebe?
Arzneim.-Forsch. 20, 817-821
- KLEMM J. (1978): Venoruton und periphere Durchblutung
in: Voelter W., Jung G. (Hrsg.): O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside
Experimentelle und klinische Ergebnisse, 191-197
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio
- KLÜKEN (1984): Therapiewoche 20
- LECOMTE J., VAN CAUWENBERGER H. (1974):
Sur quelques Propriétés Pharmacologiques du
Mono-(β -Hydroxyethyl)-7-rutoside chez le Rat
Arch. int. Pharmacodyn. 208, 317-327
- LUND F., FAGRELL B., KUNICHI J., GLENNE P.O. (1968):
in: Rapport du III. Congrès International de Phlebologie
Amsterdam 9.-13.9.1968
- LUTOMSKI J., SZPUNAR K., (1972): Bisheriger Stand der
pharmakologischen Untersuchungen über Bioflavonoide
Deutsche Apotheker-Zeitung, 112, 553-559
- MIKROVITSCH V., ROBINSON J.W.L., BEL F., GUMMA A., (1973):
Vergleichende Untersuchung am Hund zur Pharmakokinetik
zweier Darreichungsformen mit O-(β -Hydroxyethyl)-rutosid
Arzneim.-Forsch. 23, Nr.7, 967-969
- MÖRL H. (1986): Gefäßkrankheiten in der Praxis
Edition Medizin, Weinheim, Deerfield Beech, S.294
- NICKEL R., SCHUMMER A., SEIFERLE E.
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere
Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg
- NIEBERLE (1983): Diss. vet. med. LMU München
mündliche Mitteilungen
- NORDMANN H., BROILLET A., PENOCCHIO E., PONARD G. (1978):
Tierpharmakologische Untersuchungen zur Aktivität von HR im
Hinblick auf die chronisch-venöse Insuffizienz
in: Voelter W., Jung G. (Hrsg.): O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside
Experimentelle und klinische Ergebnisse, 79-92
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio

OBERMAYR M. (1984): Protektive Wirkung von Trimethyl-Hesperidin-Chalcon und Ruscus Aculeatus auf die durch Etacrynsäure geschädigte glatte Muskulatur der isolierten Pfortader der Ratte
Dissertation LMU München

PAPPENHEIMER J.R., RENKIN E.M., BORRERO L.M. (1951):
Filtration, diffusion and molecular sieving through
peripheral capillary membranes
Amer. J. Physiol. 167, 13-46

PILLER N.P. (1977): Benzopyrone Treatment of Mild Thermal Oedema:
Determination of the Most Effective Doses
Arzneim.-Forsch. 27, Nr.6, 1138-1141

RIEGER H., (1981): S.7-45
in: Ruolfski G. (Hrsg): Zirkulation - Angewandte Angiologie
Perimed Fachbuch Verlagsgesellschaft mbH, Erlangen

ROBERTSON L.A., ROSEN L.A. (1977):
The arterial endothelium, S.145-165
in: Kaley G., Altura B. (Hrsg): Microcirculation, Volume I
University Park Press, Baltimore, London, Tokio

RUDOLFSKI G. (1981): Pathophysiologie der Venen
in: Ruolfski G. (Hrsg): Zirkulation - Angewandte Angiologie
Perimed Fachbuch Verlagsgesellschaft mbH, Erlangen

RUSZNYAK S., SZENT-GYÖGYI (1963):
"Vitamin P"
Nature 138, 37

SCHMIDT H. (1978): Kurze Einführung in die Chemie der Flavonoide
unter besonderer Berücksichtigung der O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside
in: Voelter W., Jung G. (Hrsg.): O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside
Experimentelle und klinische Ergebnisse
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio

SCHMIDT-SCHÖNBEIN H., VOLGER E., WEISSJ., BRANDHUBER M. (1975):
Effect of O-(β -Hydroxyethyl)-rutosides on the Microrheology of
Human Blood under Defined Flow Conditions
Vasa 4, 263-270

SCHNEIDER W., FISCHER H. (1969):
Die chronisch-venöse Insuffizienz
Enke Verlag, Stuttgart

SPÖRRI H. (1976): Blutkreislauf
in: Scheunert A., Trautmann A. (Hrsg)
Lehrbuch der Veterinär-Physiologie, S.467-591
Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg

STARLING E.H. (1886): On the absorption of fluids
from the connective tissue space
J. Physiol., London, 19, 312-326

STUMPE K.O., KRÜCK F. (1970):
Ödempathogenese - Hämodynamische und humorale Faktoren
in: Brunner U., Kappert A. (Hrsg.): Das dicke Bein
Verlag Hans Huber, Bern, Stuttgart, Wien

VAN CAUWENBERGE H., FRANCHIMONT P. (1967).
Action du Z. 6000 (Trihydroxyethylrutoside) sur Divers
Tests d'inflammation Expérimentale chez le Rat
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 170, 74

VOELTER W. et al (1983): Flavonoide in Heilpflanzen
in: Voelter W., Jung G. (Hrsg.): O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside
Neue Ergebnisse in Experiment und Klinik, 1-24
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio

WIENERT V. (1984): Die Beinveneninsuffizienz
Schattauer Verlag, Stuttgart

WUPPERMANN TH. (1986):
Varizen, Ulcus cruris und Thrombose
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio

WURST F., REINARTZ G., KÄRCHER K.-H. (1978):
Die strahlenschützende Wirkung von Venoruton
in: Voelter W., Jung G. (Hrsg.): O-(β -Hydroxyethyl)-rutoside
Experimentelle und klinische Ergebnisse, 181-189
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio

Herrn Professor Dr. W. Felix danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und für die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. A. Petter danke ich für die Durchsicht der Arbeit und die wohlwollende Beratung.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. E. Schneider, Frau Steigerwald und Frau Schubert, die mir bei der Durchführung der praktischen Arbeiten stets ihre volle Unterstützung gewährten.

Bei Frau I. Hönig, Herrn G. Bauer und Herrn H. Hain bedanke ich mich herzlich für viele anregende Diskussionen und Ratschläge.

LEBENS LAUF

Geboren: am 25. September 1953 in Beutelsbach

Eltern: Robert Layer, Weingärtner
Frida Layer geb. Schäfer

Schulbildung: 1960-64 Grundschule Beutelsbach
1964-68 Staufergymnasium Waiblingen
1968-74 Max-Planck-Gymnasium Schorndorf
Mai 74 Reifeprüfung

Studium: 1975-82 Studium der Chemie an der
Eberhard-Karls-Universität
in Tübingen
Mai 82 Abschluß der Diplomprüfung

1982-87 Studium der Tiermedizin an
der LMU München
Juli 87 Abschluß des 3. Teils des
Staatsexamens
Sept.87 Approbation als Tierarzt

